

Laura Moreno Martínez

Implicación de la inflamación en la Esclerosis Lateral Amiotrófica: identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas

Departamento
Anatomía, Embriología y Genética Animal

Director/es
Osta Pinzolas, Rosario
Calvo Royo, ANa Cristina

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



Todos los derechos reservados

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

IMPLICACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN LA
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA:
IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES Y DIANAS
TERAPÉUTICAS

Autor

Laura Moreno Martínez

Director/es

Osta Pinzolas, Rosario
Calvo Royo, ANa Cristina

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Anatomía, Embriología y Genética Animal

2020



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Implicación de la inflamación en la Esclerosis
Lateral Amiotrófica: identificación de
biomarcadores y dianas terapéuticas.

Autor

Laura Moreno Martínez

Director/es

Rosario Osta Pinzolas
Ana Cristina Calvo Royo

Facultad de Veterinaria

2019



**Universidad
Zaragoza**

Laboratorio de Genética Bioquímica (LAGENBIO)

Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal

Facultad de Veterinaria

Universidad de Zaragoza

**IMPLICACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN LA ESCLEROSIS
LATERAL AMIOTRÓFICA: IDENTIFICACIÓN DE
BIOMARCADORES Y DIANAS TERAPÉUTICAS.**

Memoria presentada por:

Laura Moreno Martínez

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza

Zaragoza, octubre 2019



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

Doña **Rosario Osta Pinzolas**, Profesora Catedrática de Universidad, y Doña **Ana Cristina Calvo Royo**, Profesora Titular de Universidad, del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN QUE:

La Tesis doctoral titulada “Implicación de la inflamación en la Esclerosis Lateral Amiotrófica: identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas” que se recoge en la presente Memoria, de la que es autora Laura Moreno Martínez, ha sido realizada bajo nuestra dirección y se corresponde con el Proyecto de Tesis aprobado por la Comisión de Doctorado en octubre de 2015, cumpliendo, por tanto, todos los requisitos exigidos para que su autora pueda optar al Grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza con la mención de “Doctor Internacional”.

Y para que así conste, firman la presente en Zaragoza a 14 de octubre de 2019.

Fdo. Rosario Osta Pinzolas

Fdo. Ana Cristina Calvo Royo

Este trabajo ha sido financiado a través de una ayuda predoctoral para la elaboración de la Tesis Doctoral y obtención del título de Doctor concedida por el Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo, y de los siguientes organismos y proyectos:

- Proyecto: “Estudio de biomarcadores en el continuo patológico existente entre la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y la Degeneración Lobular Frontotemporal (DLFT)”. Financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” de la Unión Europea (PI14/00947. 2014-2017).
- Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-612).
- Grupo consolidado A17 LAGENBIO del Gobierno de Aragón.

A todos mis seres queridos.

“Lo más difícil es la decisión de actuar.

El resto no es más que tenacidad”

Amelia Earhart

Agradecimientos

En estas líneas me gustaría reconocer y agradecer a todas las personas con las que he coincidido durante estos años, de las cuales he aprendido y recibido su ayuda, y que, por tanto, han contribuido de una manera u otra a la elaboración de esta tesis.

A mis directoras de tesis, Charo y Ana Cris, por guiarme en este difícil pero enriquecedor camino. Gracias a Charo por confiar en mí y ofrecerme la oportunidad de iniciarme en este mundo tan bonito de la investigación, incluso antes de terminar la carrera. Gracias a Ana Cris por enseñarme tanto, desde pipetear o ajustar un pH, a tener paciencia con los western y la estadística, e incluso a diseccionar, porque una química también puede enseñar algo de anatomía a una veterinaria.

A Pilar y don Isaías por permitirme formar parte de este magnífico grupo y por transmitir esa pasión por la ciencia.

A Clemen e Inma, por sus consejos y su predisposición a colaborar y ayudar siempre que está en sus manos.

A mis compañeros de la línea de investigación de ELA con los que he coincidido en el laboratorio en algún momento durante estos años, Janne, Raquel, Miriam, Sara, Amaya, Samanta, Marcos, Alexia, Nora, Leticia, Elisa y Tresa, que siempre han estado dispuestos a ofrecerme su ayuda cuando lo he necesitado. Gracias en especial a Amaya, Samanta, Miriam y María Jesús Muñoz por enseñarme a “encandilar” a nuestros pequeños compañeros de laboratorio.

A mis compañeros del grupo de LAGENBIO, Ana Solana, Carmen, Arianne, Ana Rosa, Diego, David, Laura, Alina y Adelaida, por su ayuda en el laboratorio y todos los momentos compartidos, que han hecho que sea más fácil el camino hasta aquí.

A todas las personas con las que he tenido la oportunidad de colaborar a lo largo de todo este tiempo, en especial a los grupos de Alberto García, José Aguilera y Julián Pardo, que gracias al trabajo conjunto se ha podido elaborar gran parte de esta tesis. También a los grupos de Toxicología y Bioquímica de la Facultad de Veterinaria, en especial a Susana y Luis, que me han ayudado facilitándome el uso de sus equipos para los western y los ELISA. A Elena y Esther, por sus valiosos consejos y su ayuda desinteresada en este último tramo de la tesis.

Al servicio de animalario del CIBA, a todos los que han cuidado con especial atención a mis ratoncillos durante todos estos años, facilitándome el trabajo en todo lo posible, y a los servicios científico-técnicos del CIBA, en especial a Javier, por su apoyo técnico en la realización de los inmunoensayos.

Thanks to Prof. Matthew Wood and all members of the DPAG in the University of Oxford for the good moments which made my stay such a great experience. Especially I would like to thank Raquel for giving me the opportunity of working in her research projects and introducing me into the “cellular” world.

A mis amigas veterinarias, en especial a Diana, Desirée y Teresa, que aunque no nos veamos tanto como nos gustaría, siempre me han mostrado su apoyo y su interés por mi trabajo.

A mis covianistas, Miguel, Fran, David, Abel y Elena, por estar siempre en los momentos más necesarios demostrando que el tiempo y la distancia no hacen mella en nuestra amistad.

A mis amigas eternas, Fani, Laura, María y Sonia, por estar siempre ahí durante tantísimos años (¡y los que nos quedan!), por ayudarme a desconectar cuando más lo he necesitado. Laura, muchas gracias por tu aportación artística, dos páginas de esta tesis tienen tu huella.

A mi familia, en especial a mis padres, por vuestro apoyo incondicional y por ayudarme en todo siempre que lo he necesitado, y cuando no, también.

A Miguel, por tu infinita paciencia, sobretodo estos últimos meses. Muchas gracias por escucharme, comprenderme y conseguir animarme, siempre.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE 0

Índice

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.....	9
2.1.1. Definición.....	9
2.1.2. Epidemiología	9
2.1.3. Etiología.....	10
2.1.4. Patogenia.....	12
2.1.4.1. Excitotoxicidad mediada por glutamato	12
2.1.4.2. Desregulación de la homeostasis proteica.....	14
2.1.4.3. Daño en el transporte axonal.....	14
2.1.4.4. Disfunción mitocondrial	15
2.1.4.5. Desregulación del tráfico endosomal.....	15
2.1.4.6. Procesamiento aberrante del RNA.....	16
2.1.4.7. Disfunción en la reparación del DNA.....	16
2.1.4.8. Estrés oxidativo	17
2.1.4.9. Neuroinflamación.....	17
2.1.5. Sintomatología	18
2.1.6. Diagnóstico	19
2.1.7. Tratamiento.....	21
2.2. LA NEUROINFLAMACIÓN EN LA ELA.....	23
2.2.1. Células inmunes implicadas en la neuroinflamación en ELA.....	23
2.2.1.1. Microglía.....	23
2.2.1.2. Astrocitos.....	24
2.2.1.3. Linfocitos T.....	26
2.2.1.4. Macrófagos/Monocitos.....	27
2.2.1.5. Sistema del complemento.....	28
2.2.2. El inflamasoma NLRP3 en ELA	29
2.2.3. Estrategias terapéuticas para modular la inflamación.....	30
2.3. BIOMARCADORES EN ELA.....	33
2.3.1. Biomarcadores de imagen.....	34

2.3.2. Biomarcadores electrofisiológicos	36
2.3.3. Biomarcadores moleculares.....	37
2.3.3.1. Biomarcadores de inflamación	39
3. OBJETIVOS.....	43
4. MATERIALES Y MÉTODOS	47
4.1. MODELO ANIMAL DE ELA	49
4.1.1. Aspectos generales	49
4.1.2. Genotipado	50
4.1.3. Generación del modelo animal transgénico SOD1G93A y knock-out de granzima A .	51
4.1.4. Evaluación de la supervivencia de los animales transgénicos	52
4.2. PACIENTES.....	53
4.3. TRATAMIENTO EXPERIMENTAL CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE TTC	54
4.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	55
4.4.1. Extracción de sangre del modelo animal SOD1G93A	55
4.4.1.1. Obtención de sangre de la vena submandibular	55
4.4.1.2. Obtención de sangre cardiaca	55
4.4.2. Extracción de otros tejidos del modelo animal SOD1G93A.....	56
4.4.3. Obtención de sangre de pacientes	56
4.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....	57
4.5.1. Inmunoensayos	57
4.5.1.1. Array.....	57
4.5.1.2. Ensayos multiplex y quantibody	57
4.5.1.3. ELISA.....	58
4.5.2. Western blot	59
4.5.2.1. Extracción y cuantificación proteica.	59
4.5.2.2. Electroforesis e inmunodetección.	59
4.6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	61
4.6.1. Extracción de RNA.....	61
4.6.2. Retrotranscripción (RT-PCR)	62
4.6.3. PCR a tiempo real (qPCR)	62
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
5.1. Capítulo 1.....	71
5.2. Capítulo 2.....	83
5.3. Capítulo 3.....	101
5.4. Capítulo 4.....	121
6. CONCLUSIONES	137
7. BIBLIOGRAFÍA	141
8. ANEXOS.....	165
8.1. Anexo 1.....	167
9. ABREVIATURAS.....	187

RESUMEN

1

RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a la motoneurona superior, situada en el córtex motor, y a la motoneurona inferior, situada en el asta anterior de la médula espinal. La pérdida progresiva de motoneuronas conlleva una parálisis y atrofia muscular que desencadena el fallecimiento del paciente en un periodo promedio de 3 a 5 años tras el inicio de los síntomas, generalmente debido a un fallo respiratorio. Actualmente los únicos tratamientos que existen son paliativos, y, en la mayoría de los casos, se desconocen las causas que provocan esta enfermedad. No obstante, se han estudiado numerosos mecanismos moleculares que se han visto implicados en la patogenia de la ELA, entre ellos la inflamación. Este mecanismo está caracterizado por la activación de la microglía, astrogliosis, infiltración de los linfocitos T y monocitos, y una superproducción de citoquinas inflamatorias que conlleva a un daño progresivo en la motoneurona, contribuyendo a la progresión de la enfermedad.

El objetivo general de la presente memoria de Tesis Doctoral fue estudiar el papel de la inflamación en la ELA mediante la identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas con el fin de trasladarlos finalmente a la práctica clínica. Para ello, en primer lugar, se estudió un panel de 97 citoquinas en plasma de animales SOD1G93A presintomáticos con el fin de identificar aquellas citoquinas cuya expresión pudiera estar alterada y que además pudieran servir de ayuda al diagnóstico. Los resultados mostraron que los niveles de 16 citoquinas estaban modificados en el modelo animal con respecto a sus controles, indicando que existe una desregulación del sistema inmune en una fase temprana de la enfermedad. A continuación, se estudió la capacidad pronóstica de dichas citoquinas correlacionando sus niveles en sangre en diferentes estadios con la supervivencia de los animales SOD1G93A. A pesar de que se observó una mayor expresión de estas citoquinas en los animales que mostraron una menor supervivencia, no se pudo identificar ninguna proteína como biomarcador pronóstico debido a su gran variabilidad en sangre. Por este motivo se eligió una de las citoquinas que había mostrado una mayor correlación, la IL-6, para estudiarla en los tejidos más afectados por la enfermedad, en concreto en la médula espinal y músculo esquelético del modelo animal SOD1G93A; además, se investigó su papel como biomarcador en sangre de pacientes de ELA. Se observó un incremento en la expresión de IL-6 en los animales modelo frente a sus controles a partir del estadio sintomático temprano en el músculo extensor digital largo, que es un músculo con predominio de fibras de contracción rápida las cuales se encuentran más dañadas por la enfermedad. Estos resultados sugieren el estudio de dicha proteína como biomarcador en

músculo esquelético con predominio de fibras de contracción rápida en el modelo animal, y, en un futuro, en pacientes. Posteriormente, se investigó la modificación de las citoquinas sanguíneas desreguladas y otras proteínas relacionadas con la inflamación tras la aplicación de un tratamiento neuroprotector basado en el fragmento C de la toxina tetánica (TTC) en el modelo animal SOD1G93A para analizar la capacidad predictiva de marcadores inflamatorios para su utilización en ensayos clínicos. Los resultados mostraron una disminución en la expresión de IL-6 en plasma, médula espinal y músculo esquelético de los animales tratados con TTC, indicando que dicha proteína podría tener un papel predictivo en la enfermedad. Finalmente, se evaluó el papel de marcadores inflamatorios como dianas terapéuticas en ELA. Para ello, nos centramos en el efecto de la reducción de los niveles génicos de granzima A (gzmA), implicada en procesos pro-inflamatorios, sobre la supervivencia de los animales SOD1G93A. Los resultados mostraron que los ratones SOD1G93A heterocigotos (gzmA +/-), donde encontramos una menor expresión de gzmA, IL-1 β y GSR, vivieron más que los ratones SOD1G93A homocigotos gzmA +/+.

Esto confirmó que el aumento de la supervivencia estaba asociada a una menor expresión de este gen pero no a su ausencia, ya que los animales SOD1G93A homocigotos (gzmA -/-) no mostraron una supervivencia mayor con respecto a los controles. Por tanto, estos resultados indicaron que una reducción intermedia de los niveles de gzmA puede favorecer una progresión más lenta de la enfermedad en este modelo animal.

En conclusión, la alteración mostrada en diversas citoquinas pro-inflamatorias en el modelo animal SOD1G93A desde estadios tempranos hasta estadios terminales resulta ser muy variable, lo que dificulta su papel como biomarcadores de la enfermedad. No obstante, dicha alteración se presenta como una futura diana terapéutica para la esclerosis lateral amiotrófica.

SUMMARY

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects the upper motor neuron, located in the motor cortex, and the lower motor neuron, located in the anterior horn of spinal cord. The progressive loss of motor neurons leads to paralysis and muscular atrophy triggering the death of the patient in an average period of 3 to 5 years after the onset of symptoms, usually due to a respiratory failure. Currently there are only palliative treatments, and, in most cases, the causes that trigger this disease are unknown. However, numerous molecular mechanisms involved in the pathogenesis of ALS, including inflammation, have been studied. Inflammation is characterized by the activation of microglia, astrogliosis, infiltration of T lymphocytes and monocytes, and an overproduction of inflammatory cytokines that leads to progressive damage to the motor neuron, contributing to the progression of the disease.

The main objective of this Doctoral Thesis was to study the role of inflammation in ALS by identifying biomarkers and therapeutic targets in order to transfer them to clinical practice in the near future. Firstly, a panel of 97 cytokines was studied in plasma of presymptomatic SOD1G93A animals in order to identify those cytokines whose expression could be altered and help in the diagnosis. The results showed that the levels of 16 cytokines were modified in the animal model in comparison to their controls, indicating that there is a deregulation of the immune system at an early stage of the disease. Next, the prognostic capacity of these cytokines was studied by correlating their blood levels at different disease stages with the survival of SOD1G93A animals. Although a greater expression of these cytokines was observed in animals that showed a lower survival, no cytokine could be identified as a prognostic biomarker due to their great variability in blood. For this reason, one of the cytokines that showed a greater correlation, IL-6, was chosen and studied in the spinal cord and the skeletal muscle of the SOD1G93A animal model, which are the most affected tissues by the disease. In addition, the role of IL-6 as a biomarker in blood of ALS patients was investigated. An increase in the expression of IL-6 was observed in the animal models versus their controls from the early symptomatic stage in the extensor digitorum longus muscle, which has predominance of fast-twitch fibers that are more damaged by the disease. These results suggest the study of this protein as a biomarker in skeletal muscle with a predominance of fast-twitch fibers in the animal model, and, in the future, in patients. Subsequently, the modification of deregulated blood cytokines and other inflammation-related proteins was investigated after the application of a neuroprotective treatment based on fragment C of the tetanus toxin (TTC) in the SOD1G93A animal model to analyze the predictive capacity of inflammatory markers and its use in clinical trials. The results showed a decrease in the expression of IL-6 in plasma, spinal cord and skeletal

muscle of animals treated with TTC, indicating that this protein could have a predictive role in the disease. Finally, the role of inflammatory markers as therapeutic targets in ALS was evaluated. In this line, we focused on the effect of reducing the gene levels of granzyme A (gzmA), involved in pro-inflammatory processes, on the survival of SOD1G93A animals. The results showed that heterozygous SOD1G93A mice (gzmA +/-), where we found a lower expression of gzmA, IL-1 β and GSR, lived longer than homozygous SOD1G93A gzmA + / + mice. This confirmed that increased survival was associated to a lower expression of this gene but not to its absence, since the homozygous SOD1G93A animals (gzmA - / -) did not show a greater survival comparing to controls. Therefore, these results indicated that an intermediate reduction in gzmA levels may favor a slower progression of the disease in this animal model.

In conclusion, the deregulation shown in various pro-inflammatory cytokines in the SOD1G93A animal model from early stages to terminal stages is very variable, which hinders their role as biomarkers of the disease. Nevertheless, this alteration can be considered as a future therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis.

INTRODUCCIÓN

2

2.1. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

2.1.1. Definición

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) fue descrita por primera vez por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot en el año 1869. Englobada en el grupo de las enfermedades raras, es una de las enfermedades de la motoneurona más graves, y junto con la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson, es una de las tres principales enfermedades neurodegenerativas. Se caracteriza por producir una degeneración progresiva y, generalmente rápida, de todo el sistema neuronal motor y de la musculatura esquelética [1]. En ella se ven afectadas tanto las motoneuronas superiores como las inferiores, cursando con un endurecimiento de las columnas laterales de la médula espinal (de ahí el nombre de “esclerosis lateral”) y una atrofia muscular acompañada de debilidad y fasciculaciones (“amiotrófica”). Las parálisis y atrofia muscular progresivas conllevan al fallecimiento del paciente con una media de tres a cinco años tras el inicio de los síntomas, generalmente, debido a un fallo respiratorio.

2.1.2. Epidemiología

La incidencia de la ELA a nivel mundial es de 1,75 por cada 100.000 habitantes al año, siendo algo mayor en hombres que en mujeres, con un ratio de 1,4:1 [2]. En Europa, la incidencia asciende a 2,20 casos por cada 100.000 individuos al año [3] y muestra una prevalencia de 5,40 casos por cada 100.000 individuos [4], mientras que en la población española, la incidencia es de 1 por cada 50.000 habitantes y la prevalencia es de 1/10.000 habitantes [1]. Se ha observado que el número de casos de ELA tiende a aumentar con la edad, alcanzando un riesgo acumulado de 1 caso cada 400 habitantes a partir de los 80 años de edad [5]. Además, debido al proceso de envejecimiento cada vez mayor de la población mundial, se estima que los casos de ELA incrementen un 69% en los próximos veinte años [6].

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la incidencia de la ELA difiere según el origen ancestral y la zona geográfica, en parte debido a genes concretos así como a factores ambientales de riesgo [3]. En comparación con Europa, en Asia la incidencia es menor (0,8 casos por 100.000 individuos), mientras que en otras regiones como Guam y la península de

Kii de Japón se halló una incidencia muy alta, que se ha reducido considerablemente en los últimos treinta años sin un motivo claro [7].

2.1.3. Etiología

La mayoría de los casos de ELA son de causa desconocida y se corresponde con el tipo de ELA esporádica (ELAe). La ELAe constituye un 90-95% de los casos, mientras que tan solo un 5-10% se corresponde con la ELA familiar (ELAf) o de origen hereditario, siendo su causa una mutación conocida [8].

Una de las causas genéticas con mayor relevancia fue descubierta en el año 2013, y fue una expansión repetida en un gen no codificante de DNA, el gen *C9orf72* (*chromosome 9 open reading frame 72*), ligada al cromosoma 9p21; mientras que los sujetos sanos no tienen más de 20 repeticiones, los pacientes tienen cientos de ellas [9, 10]. No obstante, hasta la fecha se han descrito mutaciones en por lo menos 22 genes asociadas a ELA, siendo los más frecuentes *C9orf72*, el gen que codifica para la enzima antioxidante cobre/zinc superóxido dismutasa 1 (*SOD1*), *FUS* (*fused in sarcoma*) y el gen que codifica para la proteína proteína TAR de unión a DNA/RNA (*TARDBP/TDP43*) [11] (Tabla 1). El 20% de la ELAf está causada por la mutación dominante del gen de la *SOD1* en el cromosoma 21q22. La *SOD1* es la principal enzima antioxidante citosólica, por lo que una mutación en el gen de la *SOD1* implica un fallo en la función de esta enzima, resultando en un aumento de los radicales libres, tóxicos para las células. Sin embargo, no es la falta de actividad de esta enzima la que causa la enfermedad, sino la formación de agregados que afectan a diversos procesos como la respiración mitocondrial y el transporte axonal [12, 13]. Esta mutación, descubierta hace más de veinte años, ha permitido desarrollar un modelo animal, el primero de ELA, sobre el cuál poder estudiar la enfermedad. Lo interesante del modelo de ELAf es que las similitudes tanto clínicas como patológicas entre ELA esporádica y familiar sugieren que este modelo puede ayudar a esclarecer los mecanismos de ambas formas de la enfermedad, y así contribuir a estrategias terapéuticas en humanos [14].

A diferencia de la etiología de la ELAf, la etiología de la ELAe permanece desconocida. Sin embargo, sí que se han encontrado mutaciones en pacientes de ELAe en diversos genes, algunos de ellos coincidentes con la ELAf [15] (Tabla 1). No obstante, la ELA actualmente se considera de carácter multifactorial, ya que cada vez hay más hipótesis que apuntan a que la suma de distintos factores pueden conducir al desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, varios estudios

han relacionado la ELAe con la exposición a determinados factores ambientales de riesgo, como el humo del tabaco, la exposición a químicos (pesticidas, insecticidas o fertilizantes) y metales pesados, la radiación y los campos electromagnéticos, virus, hongos, e incluso determinados componentes de la dieta [16-18].

Tabla 1. Principales genes implicados en la ELA (Modificada [11].)

Gen	Locus cromosómico	Herencia	Prevalencia en ELAf/ELAe (porcentaje)
<i>C9orf72</i>	9p21.2	AD, DN	35/5
<i>SOD1</i>	21q22.1	AD, AR, DN	15/2
<i>FUS</i>	16p11.2	AD, DN	4/1
<i>TARDBP/TDP43</i>	1p36.22	AD	4/1
<i>CCNF</i>	16p13.3	AD	4/2
<i>NEK1</i>	4q33	AD	2/2
<i>TBK1</i>	12q14.2	AD, DN	1/1
<i>VCP</i>	9p13.3	AD, DN	1/1
<i>SQSTM1</i>	5q35.3	AD	1/<1
<i>MATR3</i>	5q31.2	AD	<1/<1
<i>CHCHD10</i>	22q11.23	AD	<1/<1
<i>PFN1</i>	17p13.2	AD	<1/<1
<i>TUBB4A</i>	2q35	AD	<1/<1
<i>UBQLN2</i>	Xp11.21	LX	<1/<1
<i>OPTN</i>	10p13	AD	<1/<1
<i>KIF5A</i>	12q13.3	AD	ND/ND
<i>HNRNPA1</i>	12q13.13	AD, DN	ND/ND
<i>HNRNPA2B1</i>	7p15.2	AD	ND/ND
<i>CHMP2B</i>	3p11.2	AD	ND/ND
<i>SETX</i>	9q34.13	AD	ND/ND
<i>SPG11</i>	15q21.1	AR	ND/ND
<i>ALS2</i>	2q33.1	AR	ND/ND

AD: autosómica dominante, AR: autosómica recesiva, DN: de novo, LX: ligado al sexo, ND: no disponible.

2.1.4. Patogenia

Los rasgos patológicos característicos en la enfermedad de la ELA son la degeneración y la pérdida selectiva de motoneuronas. Hay dos hipótesis principales sobre el proceso de degeneración de la motoneurona en la ELA: la hipótesis de "*dying-forward*", que es la teoría clásica, y la teoría de "*dying-back*", la que actualmente está aceptada por la comunidad científica. La primera propone 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 [19]. En cambio la hipótesis de "*dying-back*" sugiere que la degeneración de las motoneuronas en la ELA comienza distalmente en el terminal nervioso o en la placa motora, y progresa hacia el soma [20]. En apoyo a esta última hipótesis, en los últimos años se ha demostrado que la degeneración temprana de la placa motora o unión neuromuscular precede a la pérdida de neuronas en la médula espinal de ratones transgénicos SOD1 [21, 22].

Son numerosas las teorías propuestas para tratar de explicar la patogenia de la ELA. Aunque actualmente no se conocen los mecanismos moleculares precisos que provocan la muerte de dichas células, sí que hay diversas hipótesis, como las alteraciones en el funcionamiento del RNA y en el procesamiento de proteínas anómalas, la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, alteraciones mitocondriales, la activación glial o neuroinflamación, y daño en el transporte axonal [1, 10] (Figura 1).

A continuación se describen más detalladamente los mecanismos patológicos que se han visto implicados en la ELA hasta el momento.

2.1.4.1. Excitotoxicidad mediada por glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC). Tras la liberación y la interacción del glutamato con los receptores postsinápticos, los transportadores de recaptación de glutamato eliminan este neurotransmisor de la hendidura sináptica, desapareciendo de esta forma los estímulos excitatorios. El transportador de glutamato EAAT2 (*excitatory amino acid transporter 2*) es el más abundante de estos transportadores [23].

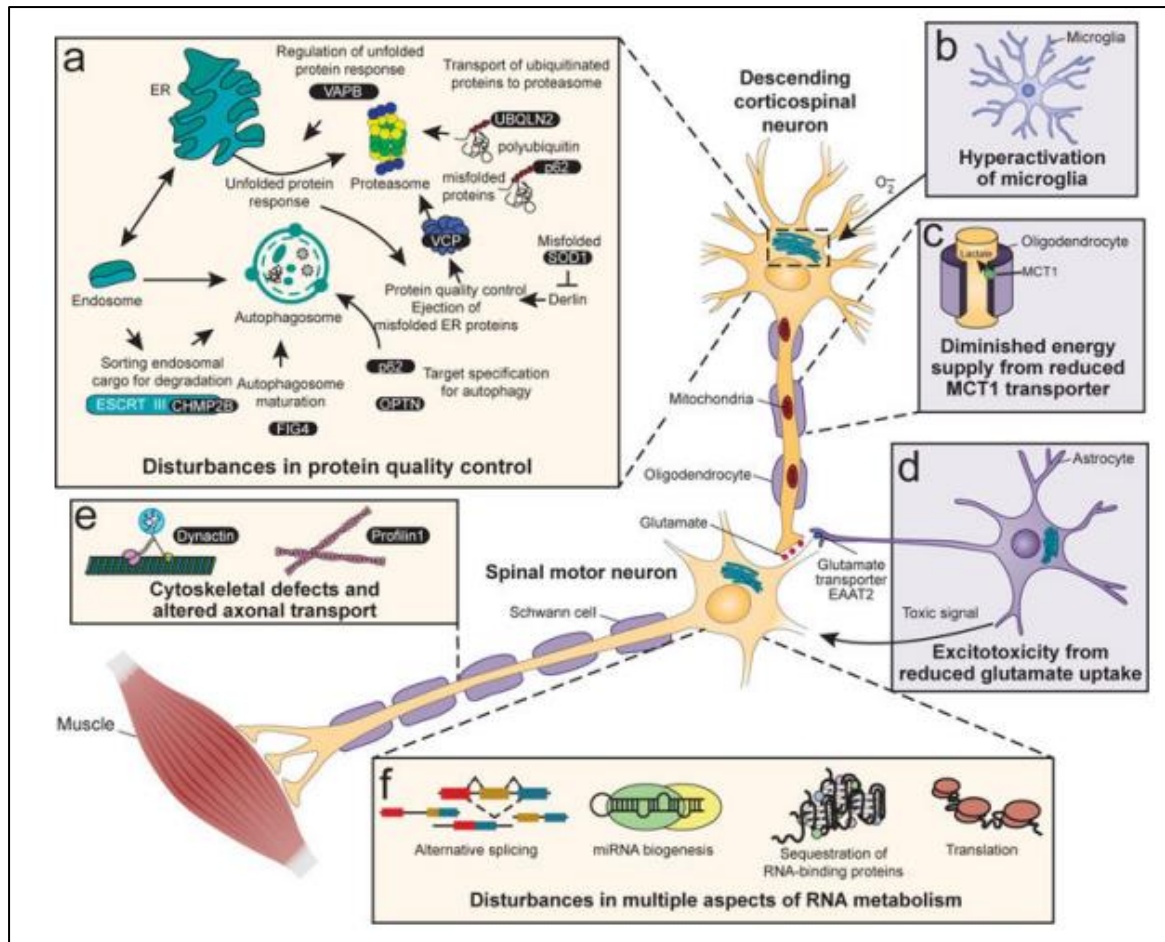


Figura 1. Representación esquemática de los principales mecanismos celulares patogénicos implicados en la ELA [24].

La excitotoxicidad es una lesión neuronal inducida por una excesiva estimulación de receptores de glutamato, que conlleva una alteración de la homeostasis del calcio y una excesiva producción de radicales libres. A diferencia de otro tipo de neuronas, las motoneuronas son especialmente sensibles a la toxicidad inducida por la entrada de calcio provocada por una excesiva acumulación de glutamato. Esto se debe principalmente a su baja capacidad para neutralizar el calcio y porque poseen receptores ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), que son más permeables al calcio [25]. Por otra parte, se ha demostrado que EAAT2 se encuentra dañado en la ELA, principal proteína transportadora de glutamato en los astrocitos, lo que da lugar a una excesiva cantidad de glutamato en la sinapsis, y como consecuencia, desencadena una toxicidad a la motoneurona [7].

2.1.4.2. Desregulación de la homeostasis proteica

Uno de los hallazgos patológicos más ampliamente investigados en la ELA ha sido la acumulación de agregados proteicos y los defectos en las vías celulares para la degradación de proteínas. De los genes anteriormente descritos y asociados a la ELA, la *SOD1* mutada forma con frecuencia agregados proteicos intracelulares. Otros genes que también se encargan de la homeostasis y degradación de las proteínas y que se han identificado mutaciones en ellos son *VCP* (*valosin containig protein*), *OPTN* (*optineurin*), *TBK1* (*TANK Binding Kinase 1*), *VAPB* (*vesicle associated membrane protein associated protein B*), *UBQLN2* (*Ubiquilin-2.*) y *SQSTM1/p62* (*sequestosome-1*) [5, 7]. Las mutaciones en estos genes conllevan a la traducción de proteínas mal plegadas, formando agregados proteicos que se localizan en lugares celulares anormales, así como a un mal funcionamiento de los mecanismos de autofagia y del sistema ubiquitina-proteasoma. Por otro lado, también se han asociado mutaciones en *SOD1* y *TARDBP* a una desregulación de las proteínas de chaperonas, cuya función es ayudar al plegamiento de otras proteínas recién formadas en la síntesis de proteínas [26, 27].

2.1.4.3. Daño en el transporte axonal

El transporte axonal, dependiente del ATP, es imprescindible para aportar componentes celulares esenciales, como RNA, proteínas, lípidos y orgánulos, a las terminaciones axonales y al soma celular. Está mediado principalmente por microtúbulos y proteínas motoras asociadas, dineínas y kinesinas [13]. En varios estudios llevados a cabo en pacientes y modelos animales de ELA han observado una denervación, retracción axonal y una alteración tanto en el transporte anterógrado como retrógrado en estadios tempranos de la enfermedad [28, 29]. Anteriormente se pensaba que las alteraciones en el transporte axonal eran consecuencia secundaria de otros procesos que ocurrían en la ELA, como la insuficiente producción de ATP debido a la disfunción mitocondrial o los agregados proteicos [30, 31]. Sin embargo, recientemente se han descrito mutaciones en genes codificantes de proteínas que están directamente involucradas en el transporte axonal en pacientes de ELA, como *DCTN* (*dynactin*), *PFN1* (*profilin 1*), *TUBA4A* (*tubulin Alpha 4a*), *NEFH* (*neurofilament heavy polypeptide*) [7].

2.1.4.4. Disfunción mitocondrial

Además de su capacidad para producir ATP, las mitocondrias desempeñan un papel esencial en el metabolismo intermediario y en el mantenimiento de la homeostasis del calcio celular. Las mitocondrias son también la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) y están involucradas en las vías apoptóticas intrínsecas. En consecuencia, la disfunción mitocondrial puede conducir al fracaso bioenergético, al estrés oxidativo y a la apoptosis [32].

La alta carga metabólica de las motoneuronas y su consecuente dependencia de la fosforilación oxidativa las hacen particularmente vulnerables a la pérdida de la función mitocondrial. Tanto en pacientes como en modelos animales de ELA con la SOD1 mutada se han observado cambios morfológicos de la mitocondria, desencadenando un mal funcionamiento [33-35]. Por ejemplo, en modelos animales se han visto agregados de SOD1 en el espacio intermembranoso de la mitocondria, lo que conlleva a una peor captación de proteínas [36]. Además, también se ha observado en pacientes y modelos animales defectos en la cadena respiratoria y fallos en el transporte axonal de mitocondrias [37, 38]. Por otro lado, también se ha visto comprometida la función mitocondrial en casos de ELAf de *FUS* y *TDP43*, así como en casos de ELAe [39].

2.1.4.5. Desregulación del tráfico endosomal

Otro mecanismo que está alterado en la ELA es el tráfico endosomal. La endocitosis es un proceso mediante el cual una célula incorpora moléculas extracelulares englobadas por membrana plasmática que, al cerrarse, se forman vesículas que quedan en el interior celular. El transporte de estas vesículas por el citoplasma hasta su destino final se denomina tráfico endosomal, y es un mecanismo complejo en el que intervienen el citoesqueleto, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, además de las propias vesículas [40].

Varios de los genes en los que se han identificado mutaciones en pacientes con ELA participan en la regulación del tráfico endosomal. Por ejemplo, se ha demostrado que la pérdida de función de TDP43 altera los endosomas dendríticos e inhibe el tráfico endosomal, lo que perjudica a las motoneuronas [41]. Además, también se han descrito otros genes cuyas mutaciones conllevan a una alteración en el tráfico endosomal, como *C9orf72*, *ALS2* (*alsin rho*

guanine nucleotide exchange Factor ALS2), *UNC13A* (*unc-13 homolog A*), *CHMP2B* (*charged multivesicular body protein 2B*), y *SPG11* (*spastic paraplegia 11*) [7, 42, 43].

2.1.4.6. Procesamiento aberrante del RNA

La alteración del procesamiento de RNA mensajero (mRNA) es un rasgo característico en la patogénesis de la ELA. Cuatro de los genes en los que más frecuentemente se encuentran mutaciones, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* y *C9orf72*, están implicados en procesos del metabolismo del RNA, como la transcripción, el transporte y la estabilización del RNA, el *splicing* alternativo, o la biogénesis de micro-RNA (miRNA) [44]. Por ejemplo, *TARDBP* y *FUS* en sus formas mutadas pasan a localizarse del núcleo al citoplasma, lo que resulta en un fallo en el procesamiento de los RNA en los que están implicados [45, 46]. Por otro lado, las expansiones repetidas de *C9orf72* conllevan a la formación de secuencias cuádruples de G estables que interfieren con otros factores de procesamiento de RNA [47, 48]; además, también conducen a una ganancia de función tóxica del mRNA a través de la formación de focos de RNA, lo que conlleva su secuestro en gránulos de estrés y a una alteración en la actividad de proteínas de unión a RNA [49].

A parte de estos genes principales, hay otros genes minoritarios en los que se han descrito mutaciones en la ELA que también juegan un papel importante en el procesamiento del RNA, como es el caso de *ATXN2* (*Ataxin 2*), *TAF15* (*TATA-box binding protein associated factor 15*), *hnRNPA1* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*), *hnRNPA2 B1N* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1*), *MATR3* (*matrin 3*), *EWSR1* (*Ewing sarcoma breakpoint region 1*), *TIA1* (*T-cell-restricted intracellular antigen-1*), *SETX* (*senataxin*) and *ANG* (*angiogenin*) [44].

2.1.4.7. Disfunción en la reparación del DNA

El DNA se daña constantemente de muchas formas. En las neuronas, una de las principales causas de dicho daño son las ROS. La producción de ROS a partir de la respiración mitocondrial y otros procesos metabólicos genera continuamente numerosos cambios de bases y de la estructura del DNA [50]. Además, en la ELA se han identificado mutaciones en varios genes relacionados con la reparación del DNA, como *FUS*, *NEK1* (*NIMA related kinase 1*) y *C21orf2*. Sin embargo, a día de hoy no está claro el papel que pueda tener la mala regulación de la reparación del DNA en la ELA [7].

2.1.4.8. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre la generación y eliminación de radicales libres o cuando la célula no puede reparar o eliminar el daño causado por este estrés. Diversos estudios han sugerido el estrés oxidativo como uno de los mecanismos patogénicos implicados en la ELA. Por ejemplo, se han detectado marcadores de daño por radicales libres en muestras de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de ELA [51-53]. Asimismo, en modelos animales de ELA con la hSOD1 mutada, se ha observado un incremento de los niveles de oxidación de diferentes mRNA en estadios tempranos de la enfermedad, además de una correlación entre dicha oxidación y una disminución de la expresión de la SOD1 [23].

Actualmente, la hipótesis más ampliamente aceptada es que, además del daño que causa directamente el estrés oxidativo, también promueve otros mecanismos patogénicos que contribuyen al daño neuronal, como la excitotoxicidad, la agregación de proteínas, desregulación del tráfico endosomal y la disfunción mitocondrial [23].

2.1.4.9. Neuroinflamación

Durante los últimos años la neuroinflamación ha resultado ser un proceso de gran relevancia en la patogenia de la ELA, ya que se ha demostrado que tiene un papel importante en el daño neuronal y la progresión de la enfermedad. Este mecanismo se caracteriza por la activación de la microglía, astrogliosis, infiltración de los linfocitos T y monocitos, y una superproducción de citoquinas inflamatorias [54]. Inicialmente en la ELA se produce una fase temprana anti-inflamatoria en la cual los astrocitos y la microglía M2 secretan factores neurotróficos y citoquinas anti-inflamatorias, como la interleuquina (IL)-4 y IL-10. Conforme avanza la enfermedad, esta respuesta neuroprotectora pasa a una fase citotóxica debido a la activación de la microglía M1 y la consecuente liberación de factores tóxicos, como ROS, y citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1 β y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , lo que conlleva a un daño progresivo a la motoneurona [55].

2.1.5. Sintomatología

Clínicamente, la ELA se caracteriza por una debilidad y atrofia muscular progresiva. La duración de la enfermedad es relativamente corta, produciéndose el fallecimiento en la mayoría de los casos entre 2 y 5 años después del inicio de los síntomas y se debe, en general, al fallo de los músculos respiratorios. Únicamente entre un 5-10% de los pacientes sobreviven durante más de 10 años. La edad a la que se manifiesta la enfermedad varía según se trate de ELAe o de ELAf. Normalmente, la media de edad de inicio de la enfermedad en la ELAe es de 56 años, mientras que en ELAf es de 46 años. Sin embargo, aunque de forma minoritaria, también existen formas juveniles en las que los síntomas se inician antes de los 30 de edad [1]. Incluso actualmente se conoce una forma todavía más rara, que es la forma infantil, habiendo identificado cinco casos en el mundo, dos de ellos en nuestro país.

La mayoría de los pacientes (alrededor del 70%) presentan ELA de inicio en las extremidades, alrededor del 25% de los pacientes tienen ELA de inicio bulbar, y el resto de los pacientes (5%) manifiestan síntomas respiratorios o inicio del tronco. Los síntomas que presenta cada paciente dependen de qué región neurológica es la que se encuentra afectada. El inicio bulbar está asociado con la motoneurona superior y/o inferior, y los pacientes presentan disfagia y disartria. En este caso, la sintomatología depende de las motoneuronas que están afectadas; la parálisis bulbar (motoneurona inferior) se asocia con una deficiencia en el movimiento palatal con debilidad, emaciación y fasciculación de la lengua; en cambio, la parálisis pseudobulbar (motoneurona superior) se manifiesta con movimientos bruscos de mandíbula, disartria y labilidad emocional. El inicio cervical se asocia con síntomas de las extremidades superiores, ya sean bilaterales o unilaterales, que afectan a las motoneuronas superiores y/o inferiores. La debilidad proximal conlleva problemas que afectan a las actividades diarias del paciente, como lavarse el cabello o peinarse, y dificultades para realizar movimientos precisos, como atrapar y manipular objetos pequeños. El inicio lumbar está relacionado con las motoneuronas inferiores y los síntomas incluyen fasciculaciones, emaciación y debilidad [18] (Tabla 2).

Tabla 2. Fenotipos clínicos, síntomas y pronóstico de la ELA. [18]

Fenotipo	Región	Síntomas	Pronóstico
Inicio en extremidades	MNS	Espasticidad, debilidad y aumento de los reflejos osteotendinosos	Supervivencia de 5-8 años
	MNI	Fasciculaciones, emaciación y debilidad distal ascendente gradual.	
Inicio bulbar	MNS	Disartria espástica, que se caracteriza por un habla lenta, laboriosa y distorsionada	Supervivencia de 2-4 años
	MNI	Debilidad de la lengua, fasciculaciones, acompañado de disartria flácida y disfagia	
Esclerosis lateral primaria	MNS	Tetraparesia espástica ascendente con participación del habla en la mayoría de los casos a los 3 años, incontinencia urinaria.	Progresión lenta, supervivencia de décadas
Atrofia muscular progresiva	MNI	Fenotipo peor definido. Debilidad asimétrica y emaciación, a menudo en las piernas.	Aproximadamente 5 años
ELA-DFT	MNS, MNI y córtex	Presentación con DFT. Desarrollo tardío de los síntomas de ELA.	Supervivencia menor de 3 años

DFT: demencia frontotemporal, ELA: esclerosis lateral amiotrófica, MNI: motoneurona inferior, MNS: motoneurona superior.

2.1.6. Diagnóstico

El diagnóstico de la ELA es complejo debido a su gran heterogeneidad clínica, lo que resulta en un retraso del diagnóstico definitivo de hasta un año tras el inicio de los síntomas [10]. Dada la ausencia de una prueba diagnóstica específica de la enfermedad, el diagnóstico se basa en los datos clínicos y se confirma o descarta con pruebas complementarias que incluyen la electromiografía (EMG), la resonancia magnética (RM), estudios del LCR y biopsias de músculo y nervios. Además, también se basa en la exclusión de otras situaciones que simulan la enfermedad de la motoneurona. Esta dificultad en el diagnóstico de la ELA ha llevado a instaurar unos criterios internacionales, conocidos como “Criterios de El Escorial”, que se establecieron como requisitos para el diagnóstico de enfermos de ELA, y que se han ido revisando y modificando [56] (Tabla 3). Estos criterios incluyen, por un lado, la presencia de evidencias de degeneración de motoneurona inferior (MNI) por examen clínico, electrofisiológico o neuropatológico, la presencia de evidencias de degeneración de motoneurona superior (MNS) por examen clínico y la presencia de una diseminación progresiva de los síntomas o signos en la región afectada, o la progresión hacia otras regiones, determinado por historia y examen

neurológico. Por otro lado, también incluyen la ausencia de evidencias electrofisiológicas o patológicas de otras enfermedades que pudieran explicar los signos de degeneración de MNS y/o MNI, y la ausencia de evidencias por neuroimagen de otras enfermedades que pudieran explicar los signos clínicos y electrofisiológicos observados. En el caso de que haya antecedentes familiares se realizan análisis genéticos para confirmar que pueda ser ELAf.

Tabla 3. Los criterios de El Escorial y sus revisiones [57]

Criterios	<i>El Escorial (1994)</i>	<i>Airlie House (2000)</i>	<i>Awaji-Shima (2008)</i>
ELA definitiva	Signos clínicos de MNI y MNS en 3 regiones (bulbar, cervical, torácica o lumbar).	Signos clínicos de MNI y MNS en región bulbar y dos regiones espinales, o signos de MNS en dos regiones espinales y signos de MNI en tres regiones espinales.	Signos clínicos o electrofisiológicos de MNS y MNI en región bulbar y dos regiones espinales, o signos de MNS y MNI en tres regiones espinales.
ELA probable	Signos clínicos de MNI y MNS en 2 regiones, con signos de MNS en regiones rostrales a las de MNI.	Signos clínicos de MNI y MNS en 2 regiones, con signos de MNS en regiones rostrales a las de MNI.	Signos clínicos o electrofisiológicos de MNS y MNI en dos regiones, con signos de MNS en regiones rostrales a las de MNI.
ELA probable apoyada por exámenes complementarios	-	Signos clínicos de MNS en una región y criterios electrofisiológicos de MNI en 2 regiones.	-
ELA posible	Signos clínicos de MNI y MNS en 1 región, o signos de MNS en dos regiones, o signos de MNI en regiones rostrales a las de MNS.	Signos clínicos de MNI y MNS en 1 región, o signos de MNS en dos regiones, o signos de MNI en regiones rostrales a las de MNS.	Signos clínicos o electrofisiológicos de MNS y MNI en una región, o signos de MNS en dos regiones, o signos de MNI en regiones rostrales a las de MNS.
Sospecha de ELA	Signos clínicos de MNI.	-	-

MNI: motoneurona inferior, MNS: motoneurona superior.

Sin embargo, los sistemas de clasificación como los criterios de El Escorial y sus revisiones son enfoques sistemáticos a veces complicados de interpretar y que omiten características que son importantes en el manejo clínico, como el ratio de progresión o la base genética [57, 58]. Por lo tanto, muchos neurólogos actualmente utilizan otros tipos de clasificaciones no tan sistemáticas que pueden incluir, por ejemplo, descripciones anatómicas

como el síndrome de brazos flotantes o diplejía braquial bilateral. A falta de un biomarcador diagnóstico de ELA, resulta necesario abordar una nueva estrategia que combine los aspectos positivos de las clasificaciones sistémicas con las descripciones fenotípicas utilizadas en la práctica clínica [57].

2.1.7. Tratamiento

A pesar de todas las teorías existentes sobre la etiopatogenia de la enfermedad, actualmente, el tratamiento es únicamente paliativo. Se han ensayado numerosas sustancias con potencial de interferencia en posibles mecanismos patogénicos de la enfermedad, pero solo hay dos tratamientos aprobados hasta la fecha: riluzol y edaravone [59]. El riluzol es un antagonista del glutamato, y su eficacia está basada en su capacidad de antagonizar la toxicidad del glutamato en la patogénesis de la enfermedad. Este fármaco ha mostrado una disminución de la progresión de la enfermedad en algunos pacientes, aunque no en todos, logrando alargar la vida de 2 a 3 meses [18]. Por otra parte, edaravone mejora ligeramente la movilidad en algunos pacientes, sobre todo cuando se aplica en fases tempranas de la enfermedad. Este último se aprobó por la FDA en mayo de 2017, y en Europa se está a la espera de su aprobación. Su mecanismo de acción se basa en su efecto antioxidante mediante la eliminación de peróxidos lipídicos y radicales hidroxilos [18].

Actualmente se están estudiando diversas terapias que se encuentran en ensayos preclínicos o clínicos en ELA. Estas terapias incluyen aproximaciones farmacológicas frente a los diferentes mecanismos patogénicos descritos en la ELA, como la excitotoxicidad por glutamato, el estrés oxidativo o la neuroinflamación, y terapias más innovadoras como la administración de neurotróficos mediante proteínas recombinantes, la terapia génica, y la terapia celular [18] (Figura 2). Uno de los agentes con más posibilidades de que se apruebe y que próximamente va a estudiarse en un ensayo clínico de fase III es masitinib, un inhibidor de la tirosina quinasa que es capaz de inhibir la proliferación de las células gliales y su activación, incluyendo los fenotipos malignos que inducen la muerte de las motoneuronas [60].

Por otro lado, el conocer las diferentes mutaciones genéticas que causan la ELA proporciona potenciales dianas terapéuticas, incluso aunque no se lleguen a comprender completamente los mecanismos patológicos desencadenados por el gen mutado. Es por ello que se están estudiando oligonucleótidos antisentido que, por ejemplo, en el caso de las

expansiones repetidas de *C9orf72*, estos oligonucleótidos se dirigirían a estas transcripciones que contienen repeticiones y causarían su degradación [5, 60].

Más recientemente se están ensayando terapias basadas en células para el tratamiento de la ELA [61]. Estas terapias, cuyo objetivo es retrasar el progreso y los síntomas de la enfermedad, se han propuesto como una fuente fundamental para la regeneración de motoneuronas. Las células que se utilizan para trasplantar en la ELA tienen principalmente dos orígenes: uno es de células madre mesenquimales (MSCs), como las MSCs derivadas de la médula ósea, las MSCs derivadas de tejido adiposo, las células madre hematopoyéticas CD133+ (HSC), y células progenitoras hematopoyéticas CD34 + de cordón umbilical. El otro origen engloba a las células madre neurales de origen de tejido neural (NPCs), como la médula espinal de origen fetal y el glía envolvente olfativo [62]. Por otro lado, el trasplante autólogo de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) se ha probado en varios modelos animales mostrando una mejoría en los síntomas [63].

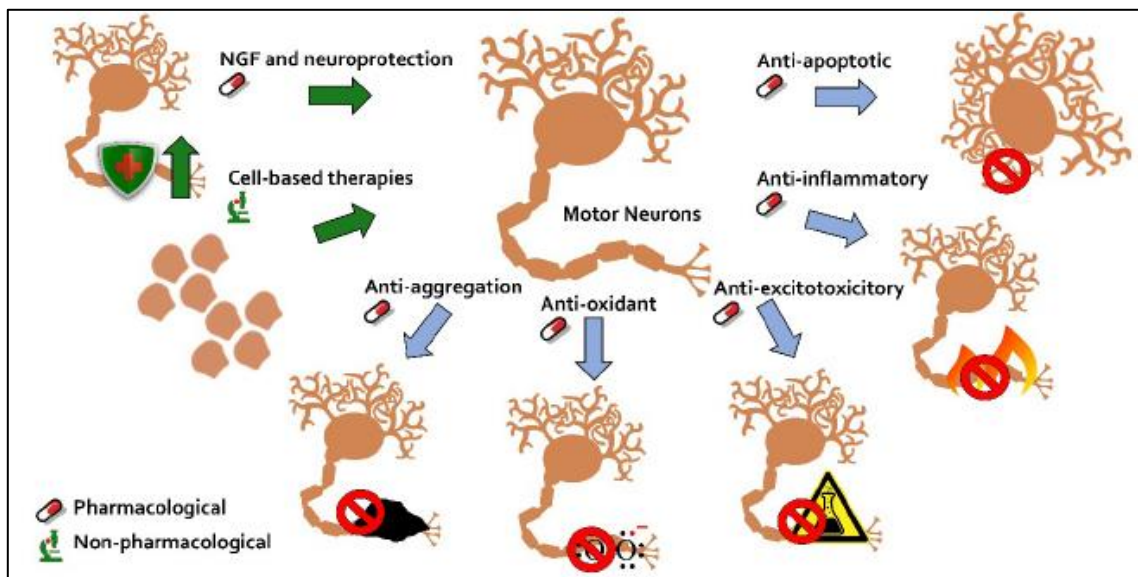


Figura 2. Resumen de los principales abordajes para el tratamiento de la ELA. [18]

2.2. LA NEUROINFLAMACIÓN EN LA ELA

Durante las dos últimas décadas se ha demostrado que la neuroinflamación contribuye a la pérdida progresiva de las motoneuronas en enfermedades neurodegenerativas, incluida la ELA [64]. Diversos ensayos clínicos y preclínicos han mostrado además que las mutaciones en genes asociados a la ELA, como *SOD1*, *TARDBT* y *C9orf72*, acentúan esta neuroinflamación [54]. Por otro lado, también se ha observado un aumento de los monocitos pro-inflamatorios y poblaciones de linfocitos T disfuncionales en casos en los que no se dan estas mutaciones, lo que apoya la total implicación de la desregulación del sistema inmune en la patogénesis de la ELA [54].

La neuroinflamación se caracteriza por la activación de la microglía y la astrogliosis en el SNC, por la infiltración de linfocitos y macrófagos periféricos, y por la implicación del sistema del complemento. Los factores anti-inflamatorios y neuroprotectores, como la microglía anti-inflamatoria (M2) y los linfocitos T, predominan en la fase temprana de la enfermedad, mientras que la inflamación se vuelve pro-inflamatoria y neurotóxica, liderada por la microglía pro-inflamatoria (M1) y linfocitos Th1, a medida que la enfermedad avanza [55, 65] (Figura 3).

Aunque el mecanismo de neuroinflamación se ha considerado como una respuesta secundaria e inespecífica a la degeneración de las motoneuronas, estudios recientes señalan este proceso como un evento primario debido a la interacción perjudicial entre las motoneuronas dañadas y las células del entorno [66]. De hecho, se ha demostrado en el ratón transgénico SOD1G93A que existe una activación microglial anterior a la muerte de las motoneuronas [55].

2.2.1. Células inmunes implicadas en la neuroinflamación en ELA

2.2.1.1. Microglía

Las células de la microglía forman parte del sistema inmune innato del SNC. Sus funciones principales son controlar el microambiente mediante diversas señales, dar soporte mecánico a las neuronas y eliminar los residuos después de la muerte celular [67].

Durante la neuroinflamación, la microglía se encarga de liberar citoquinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, y de eliminar células dañadas [67]. De esta forma, en la

ELA la microglía es capaz de ejercer papeles opuestos dependiendo de la fase de la enfermedad. Durante la etapa temprana de progresión lenta de la enfermedad, la microglía muestra el fenotipo M2, que promueve la reparación y regeneración tisular, e interacciona con señales protectoras como CD200 y fractalquina. A medida que la enfermedad progresa, las motoneuronas dañadas liberan señales que inducen a la microglía a adoptar el fenotipo M1, las cuales secretan NADPH oxidasa 2 (NOX2), ROS y citoquinas pro-inflamatorias [68]. En referencia a estos dos fenotipos de la microglía, hay estudios *in vitro* que han demostrado que la microglía M2 mejoró la supervivencia de las motoneuronas, mientras que la microglía M1 resultó ser tóxica para las mismas [69].

Por otro lado, se ha observado que las motoneuronas y astrocitos dañados que liberan agregados proteicos, como los de SOD1, son capaces de activar la microglía a través de vías dependientes de CD14, y de los receptores TLR2 (*toll-like receptor 2*), TLR4 (*toll-like receptor 4*) y SR (*scavenger receptor*) [70-72]. Además, también se ha demostrado que existe una correlación entre la intensidad de la activación microglial en la corteza motora y la severidad del daño de las motoneuronas [73]. En el ratón transgénico SOD1G93A se han llevado a cabo estudios en los que se observó que el reemplazo de la microglía con la SOD1 mutada por microglía sin la mutación retrasó la degeneración de las motoneuronas y aumentó la supervivencia de los animales [74, 75]. A parte de la relación de la SOD1 mutada con la microglía, también se ha asociado la pérdida de función de *C9orf72* con una disminución de la actividad microglial para eliminar los agregados proteicos [76].

2.2.1.2. Astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC y tienen muchas funciones complejas, entre las que se incluyen la regulación de las concentraciones de neurotransmisores extracelulares, el mantenimiento del equilibrio homeostático metabólico o iónico, proporcionar soporte estructural y trófico para las neuronas, y contribuir a la respuesta inmune [55]

Los astrocitos participan de forma activa en la neuroinflamación, pudiendo resultar su acción beneficiosa o perjudicial para la reparación de los tejidos dependiendo de los tipos de señales que haya en el ambiente. En este sentido, hay estudios que han mostrado que algunas respuestas de los astrocitos a ciertas citoquinas, factores de crecimiento y hormonas son protectoras, mientras que su ausencia agrava el daño en el SNC [77]. Una de las vías protectoras principales está mediada por la glicoproteína gp130, un transductor de señal esencial para los

miembros de la familia de la citoquina IL-6. Por otro lado, los astrocitos liberan factor de crecimiento transformador-beta ($TGF-\beta$), que suprime la acción neuroprotectora de la microglía y los linfocitos T. Se ha visto tanto en pacientes como en modelos animales de ELA que la ruta metabólica de $TGF-\beta$ se encuentra más estimulada, lo que lo convierte en un regulador negativo de la respuesta inflamatoria neuroprotectora [77].

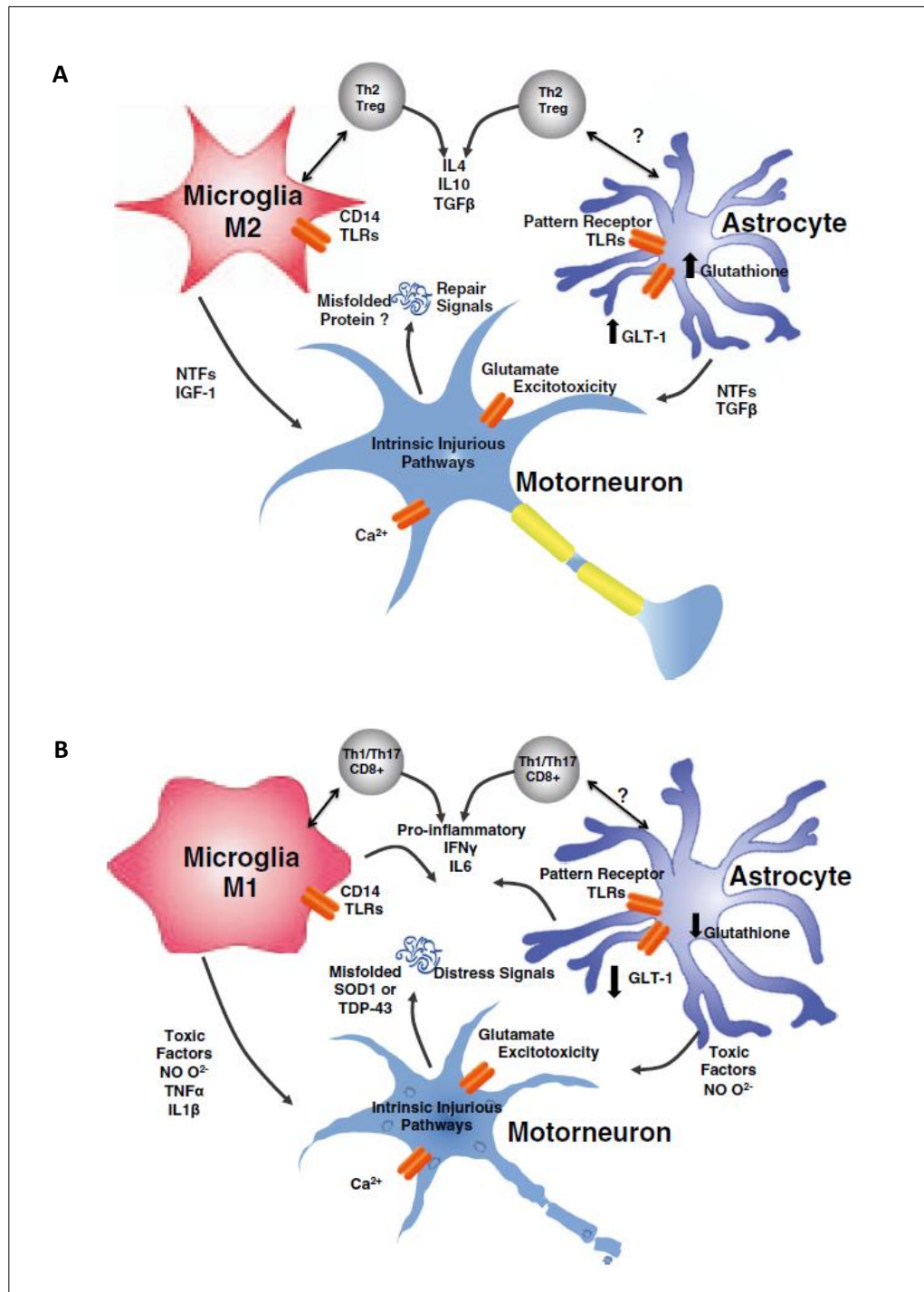


Figura 3. Fases neuroprotectora (A) y neurotóxica (B) de la neuroinflamación en la ELA [55].

De forma similar a lo que ocurre en la microglía, las mutaciones de los genes asociados a la ELA también se expresan en los astrocitos, desencadenando procesos dañinos para las motoneuronas. En diversos estudios basados en el modelo animal de ELA, con la silenciación del gen mutado de la SOD1 o el trasplante de astrocitos sanos se consiguió una reducción de la toxicidad y pérdida de motoneuronas, además de un aumento de la supervivencia de los ratones [78-81]. De forma similar, otros estudios han demostrado que el trasplante de astrocitos que expresan la SOD1 mutada en animales sanos fue capaz de inducir una degeneración y muerte local de las motoneuronas de la médula espinal [82].

Como se ha mencionado anteriormente, una de las funciones de los astrocitos es la regulación de las concentraciones de neurotransmisores extracelulares. En condiciones normales, los astrocitos son capaces de eliminar el exceso de glutamato de la hendidura sináptica a través de los transportadores de glutamato. Sin embargo, en pacientes y modelos animales de ELA se ha visto que la pérdida del transportador de glutamato EAAT2 conlleva a una menos eficiente recaptación del glutamato por los astrocitos, lo que contribuye a la degeneración de las motoneuronas [82-85].

Por último, más recientemente se ha demostrado que los astrocitos son capaces de 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*) [86].

2.2.1.3. Linfocitos T

Los linfocitos T forman parte de la respuesta inmune adaptativa. Existen diferentes poblaciones de linfocitos T que 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 [55]. En concreto, los linfocitos CD4+ se han observado en la médula espinal en etapas tempranas de la enfermedad, mientras que poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ predominan en los estadios más tardíos [68]. Los linfocitos T CD4+, Th (*T helper*), se pueden clasificar según su función anti- o pro-inflamatoria en aquellos que resultan ser neuroprotectores, linfocitos Th2 y linfocitos T reguladores (Treg), que se encuentran expresados en las fases tempranas de la enfermedad, o en aquellos que son neurotóxicos, los linfocitos Th1

y Th17, que promueven respuestas pro-inflamatorias en las fases más tardías de la enfermedad [55].

En pacientes de ELA se ha encontrado en sangre, médula espinal y cerebro un aumento de los niveles de los linfocitos Th1 y Th17, así como de las citoquinas que regulan, por ejemplo IL-17 y IL-23, lo que refuerza la implicación de estas células en la patogenia de la ELA [87-89]. En cuanto a los linfocitos Treg, se han encontrado incrementados en médula espinal del modelo animal SOD1G93A en el estadio de progresión lenta de la enfermedad, junto con un aumento de la expresión de IL-4 y de la microglía con fenotipo M2; por el contrario, los Treg tienden a disminuir cuando la progresión de la enfermedad es más rápida [90]. 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 (*forkhead box P3*), TGF- β , IL-4 y Gata-3 (*GATA binding protein 3*), en las fases de progresión rápida, y además se correlacionaron inversamente los niveles de Treg con el ratio de progresión y severidad de la enfermedad [90-91]. Por otro lado, se observó que una transferencia de Treg de la fase de progresión lenta de la enfermedad, provenientes de ratones SOD1G93A, alargó en el tiempo dicha fase de progresión lenta, y además aumentó la supervivencia de los ratones receptores [90].

2.2.1.4. Macrófagos/Monocitos

Los macrófagos se originan a partir de monocitos sanguíneos, formados en la médula ósea, y migran a los tejidos donde cumplen diversas funciones inmunes, cambiando de un fenotipo funcional a otro mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias [54].

Aunque se ha visto que los monocitos sanguíneos adquieren un fenotipo inflamatorio en pacientes de ELA [92], no está claro cómo contribuyen al desarrollo y la progresión de la enfermedad. Varios estudios han sugerido que los monocitos periféricos son capaces de penetrar en la médula espinal de pacientes y modelos animales de ELA, contribuyendo a la pérdida de las motoneuronas [93-95]. Sin embargo, otros estudios han demostrado que dicha infiltración en el SNC no se produce a menos que haya una alteración previa de la barrera hematoencefálica [96-100] No obstante, sí que se ha observado que los monocitos se encuentran activos en sangre de pacientes de ELA en una fase temprana de la enfermedad [92],

y se han asociado a una menor fagocitosis y una desregulación de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias [95, 101].

2.2.1.5. Sistema del complemento

Uno de los componentes principales del sistema inmunitario es el sistema del complemento. Su función es reconocer PAMPs o DAMPs (*pathogen or damage associated molecular patterns*) que expresan los patógenos o las células dañadas con el fin de eliminarlos del organismo. Este sistema cuenta con tres vías de activación, dependiendo del tipo de moléculas implicadas, sin embargo todas ellas desencadenan una serie de procesos que promueven la inflamación y estimulan la fagocitosis del microorganismo o célula, mediante el reclutamiento de monocitos y macrófagos por los factores C3a y C5a; o bien crean un poro que desestabiliza y rompe la membrana celular a través de un complejo formado por los factores C5-C9 [67, 68].

En relación con la ELA, varios componentes de este sistema, como los factores C1q, C5a y C5b-9, se han encontrado elevados en plasma, LCR y médula espinal de pacientes y modelos animales [102-105]. Además, en un estudio se observó el factor C1q depositado en las placas motoras en el músculo intercostal de pacientes de ELA, lo que sugiere que la activación del complemento puede preceder a la denervación de la placa motora [106]. Por otro lado, también se ha observado una activación local y una expresión aumentada de los factores C5a-C5aR1 en el músculo esquelético del modelo animal SOD1G93A, lo que desencadenó un reclutamiento de macrófagos que podrían estar acelerando la denervación y la muerte de las motoneuronas [107]. En este sentido, se ha visto que una inhibición selectiva de la señal de C5a-C5aR1 fue capaz de reducir los síntomas motores y aumentó la supervivencia en el ratón transgénico SOD1G93A [103, 108]. En definitiva, la activación del complemento parece que podría estar agravando 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 [67].

2.2.2. El inflamasoma NLRP3 en ELA

Otro proceso celular que se está estudiando en relación con la neuroinflamación en ELA son los inflamasomas, entre ellos el NLRP3 (*nod-like receptor family pyrin domain containing 3*). Los inflamasomas son complejos proteicos que inducen inflamación en respuesta a diversos estímulos. El inflamasoma NLRP3, que es el más conocido, tras la formación del complejo, induce la activación de la caspasa 1, que a su vez activa la IL-1 β y la IL-18 en un proceso de dos pasos [109]. 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 el segundo paso de activación es en el que se forma el complejo proteico. Tras dicha formación, NLRP3 se une a la proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) e induce la activación de la caspasa 1. A continuación, la caspasa 1 promueve la activación de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y IL- 18, las cuales estimulan finalmente la inflamación y la respuesta inmune innata [109].

En relación con la ELA, se ha demostrado que los agregados proteicos, como los de TDP43, son capaces de activar la microglía y desencadenar los procesos previamente mencionados para activar el inflamasoma NLRP3, tal y como se muestra en la figura 4 [54, 110]. Además, varios estudios han corroborado que este inflamasoma está activado en cerebro, en tálamo anterior de diferentes modelos animales de ELA [109, 111, 112], e incluso en astrocitos de pacientes [113].

Dada la implicación del inflamasoma NLRP3 en la patogenia de la ELA, en los últimos años se han desarrollado incluso algunas terapias con el fin de inhibir este complejo. Por ejemplo, la administración de 17 β -estradiol en el modelo animal SOD1G93A redujo los niveles de la caspasa 1 activa y la IL-1 β madura; además, estos ratones mostraron una mejoría en la función motora que se correlacionó con un aumento en la supervivencia de las motoneuronas de la médula espinal lumbar [114]. Otro compuesto que también ha sido capaz de inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 es el cyclo(His-Pro) (*histidyl-proline diketopiperazine*), concretamente en la microglía, lo que lo convierte en un posible candidato como modulador de este mecanismo en la ELA [115].

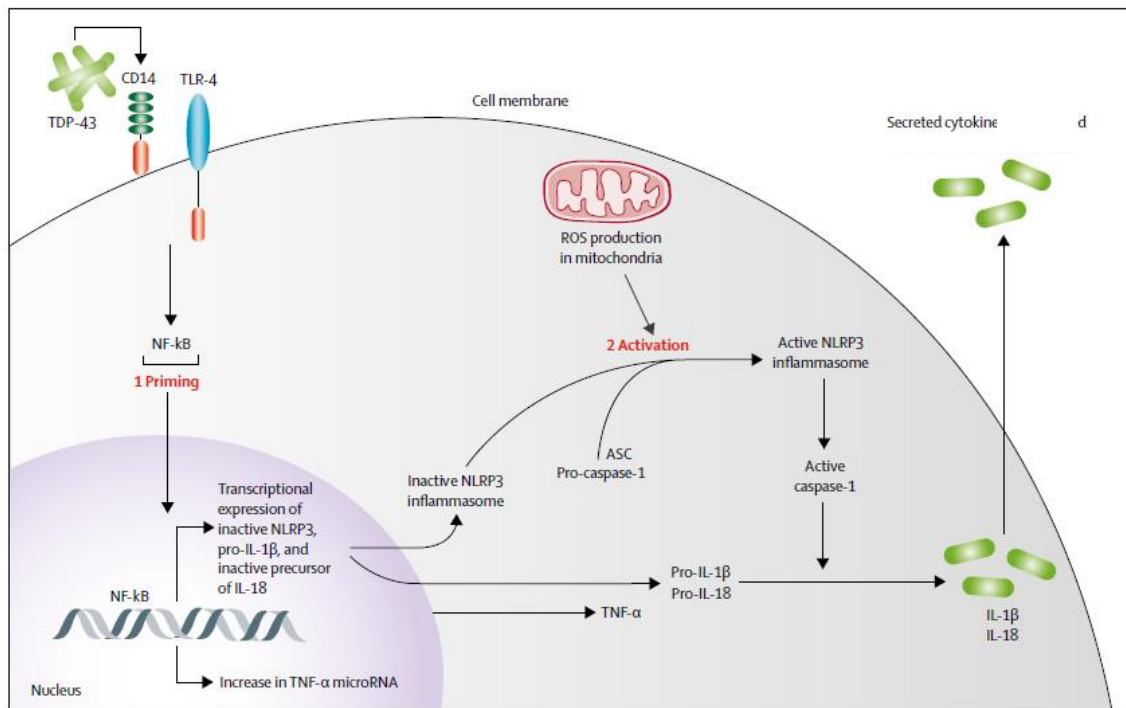


Figura 4. Modelo de las vías pro-inflamatorias de la microglía en la ELA. [54]

2.2.3. Estrategias terapéuticas para modular la inflamación

Tanto el ratio de progresión como el tiempo de supervivencia en la ELA parecen estar modulados, en parte, por un sutil equilibrio entre los factores anti-inflamatorios y pro-inflamatorios. Por tanto, un posible abordaje terapéutico podría tratar de inclinar dicho equilibrio hacia los mediadores anti-inflamatorios con el objetivo de frenar la progresión de esta enfermedad.

A lo largo de los últimos años se han desarrollado ensayos clínicos basados en esta hipótesis mediante el uso de diferentes fármacos o moléculas, que se resumen en la tabla 4 [68]. Uno de los fármacos con más posibilidades de éxito, como se ha comentado anteriormente, es masitinib, un inhibidor de la tirosina quinasa, que ha demostrado sus efectos positivos tanto en modelos animales [116] como en los ensayos clínicos que se están llevando a cabo actualmente [117]. Sin embargo, la mayoría de las terapias que han resultado ser prometedoras en los modelos animales de ELA hasta la fecha, apenas han tenido resultados positivos cuando se han trasladado a pacientes. Una de las razones de mayor peso es que el modelo animal tiene un fenotipo de la enfermedad más homogéneo en comparación con la clínica heterogénea que se observa en los pacientes. Además, también se ha apuntado a un mal diseño de los estudios en

los animales, como por ejemplo en relación al tiempo de administración de la droga, que es inadecuado ya que en los ratones se realiza antes del inicio de los síntomas, mientras que en los pacientes solo puede comenzar tras la aparición de los signos de la enfermedad [118]. Otro hándicap es que muchas de las terapias se han dirigido únicamente a un factor pro-inflamatorio en concreto. Por ejemplo, en ratones transgénicos SOD1, la disminución o eliminación de factores pro-inflamatorios como TNF- α o IL1- β ha tenido poco o ningún efecto en la supervivencia general [98, 119]. Esto parece indicar que la gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias puede compensar la ausencia de un solo factor, y es poco probable que los esfuerzos continuos para contrarrestar una sola molécula proporcionen un beneficio terapéutico significativo en los pacientes de ELA [55].

Actualmente se están desarrollando terapias celulares capaces de modular el sistema inmune que están mostrando resultados más prometedores, aunque todavía se encuentran en fases tempranas de estudio. Los linfocitos Treg se han convertido en una potencial diana terapéutica para la ELA. Como ya se han mencionado anteriormente, los Treg están relacionados con la progresión de la enfermedad y la supervivencia [54, 120]. Varios estudios han demostrado que la transferencia pasiva de Tregs o su estimulación mediante el tratamiento con un complejo de anticuerpos monoclonales de interleuquina-2 y rapamicina fue capaz de aumentar el número de Treg en modelos animales SOD1, retrasando la progresión de la enfermedad y prolongando la supervivencia de los mismos [65]. En este sentido, se está llevando a cabo una terapia anti-inflamatoria mediante un ensayo clínico que utiliza dosis bajas de IL-2 como un estimulador de los Treg [121]. Además, recientemente se ha completado un primer ensayo clínico de fase I en pacientes en el cual se infundieron Tregs autólogos expandidos a pacientes de ELA. Las infusiones eran seguras y se demostró que mejoraron tanto el número de Treg como las funciones supresoras de inflamación [122]. No obstante, hay que tener en cuenta el potencial de estas células para convertirse en células pro-inflamatorias Th17 en presencia de citoquinas pro-inflamatorias en el medio, lo que puede promover la progresión de la enfermedad [55].

Otras células, como las MSCs, iPSCs y NPCs también han mostrado su papel modulador de la neuroinflamación de la ELA, aunque con resultados menos significativos. En el caso de las MSCs derivadas de tejido adiposo o de médula ósea, se han estudiado ampliamente en modelos animales de ELA y ensayos clínicos. En concreto en los modelos animales han sido capaces de disminuir la neuroinflamación, mejorar la función motora, reducir la pérdida de las motoneuronas y aumentar la supervivencia [123, 124]. Además, también se ha demostrado en

varios ensayos clínicos la viabilidad, seguridad y sus efectos inmunomoduladores [124-126]. Sin embargo, el uso de MSCs también conlleva efectos adversos, como promover el crecimiento tumoral y metástasis, o desencadenar la generación de ROS e inflamación [127].

El uso de iPSCs parece una opción interesante para el tratamiento en la ELA. De hecho, en modelos animales se ha observado que el trasplante de células neurales derivadas de iPSCs fue capaz de generar ramificaciones axonales y reducir la gliosis [128, 129]. Sin embargo, el uso de iPSCs en la clínica resulta controvertido debido a su capacidad de formación de tumores después del trasplante, y por las dificultades que se encuentran en la metodología para su diferenciación *in vitro*.

Tabla 4. Resumen de los fármacos y moléculas dirigidos contra la neuroinflamación (modificada [68]).

Molécula	Mecanismo	Nº de ensayo	Fase
Minociclina	Supresión de la activación microglial y modulación de la apoptosis	NCT00047723	III
NP001	Modulación de la activación de los monocitos y disminución de NF- κ B en macrófagos	NCT01281631 NCT02794857	II
Masitinib	Inhibidor de la tirosina quinasa	NCT02588677	II y III
Ibudilast (MN-166)	Inhibidor de la fosfodiesterasa 4	NCT02238626 NCT02714036	II
Fingolimod	Modulador del receptor esfingosina-1 fosfato	NCT01786174	II
RNS60	Modulador de la vía PI3K-Akt	NCT02525471	I
Tocilizumab	Antagonista del receptor de IL-6	NCT02469896	II
Anakinra	Antagonista del receptor de IL-1	NCT01277315	II
Celebrexib	Inhibidor de COX-2	NCT00355576	II
Talomida	Antagonista de TNF- α	NCT00140452	II
Lenalidomida	Antagonista de TNF- α	ND	ND
AMD3100	Antagonista de CXCR4	ND	ND
NBP	Antioxidante, reducción de la activación glial	ChiCTR- IPR-15007365	II y III
Celastrol	Inhibición de citoquinas inflamatorias e inducción de la respuesta de proteínas de choque térmico	ND	ND

IL: interleuquina, COX-2: ciclooxigenasa-2, TNF: factor de necrosis tumoral, NBP: dl-3-n-butiltalida, ND: no disponible.

Las NPCs son células multipotentes que pueden auto-renovarse y expandirse fácilmente *in vitro*. Como ventaja, las NPCs derivadas de un sistema nervioso ya desarrollado parecen no causar la formación de tumores ni metástasis después del trasplante. Sin embargo, tienen ciertas limitaciones, como la replicación limitada o la disminución del potencial de diferenciación con el paso del tiempo [68]. En cuanto a la neuroinflamación, se ha observado que en un modelo animal con lesión medular, las NPCs fueron capaces de restituir el microambiente inflamatorio mediante un aumento de los linfocitos Treg y reduciendo los macrófagos con fenotipo M1 [130]. Sin embargo, recientemente se ha llevado a cabo un ensayo clínico en pacientes de ELA a los que se les inoculó NPCs en la médula espinal, no observándose ninguna mejoría significativa [131].

2.3. BIOMARCADORES EN ELA

De acuerdo con *Biomarkers Definitions Working Group*, un biomarcador se define como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o de una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica, así como un indicador de cambios funcionales y estructurales en órganos y células. Es por ello que los biomarcadores también se consideran potenciales dianas terapéuticas [132]. En función de su aplicación a una enfermedad, los biomarcadores pueden ser diagnósticos, que sirven para confirmar o descartar la enfermedad en pacientes bajo sospecha; pronósticos, útiles para predecir la evolución de un paciente que ya sufre la enfermedad; y farmacodinámicos o predictivos de la respuesta a diferentes terapias en ensayos clínicos [133].

En la ELA es imprescindible identificar biomarcadores que ayuden a diagnosticar la enfermedad en fases más tempranas, y también que ayuden a predecir el curso de la enfermedad en cada paciente para posibilitar el desarrollo de terapias más eficaces. Las características que definen el biomarcador ideal podrían resumirse, en primer lugar, en ser lo suficientemente sensible para diagnosticar la ELA en el momento de aparición de los síntomas; además, tendría que ser específico para la ELA y ser capaz de discriminarla de otras patologías neurodegenerativas que cursan con una sintomatología similar; debería poder predecir el progreso de la enfermedad en cada paciente; y, por último, convendría que fuese fácilmente accesible en todos los pacientes para poder trasladarlo a la práctica clínica con éxito [134]. A lo largo de los años se ha descrito un amplio panel de biomarcadores tanto en pacientes como en

modelos animales relacionados con los diferentes mecanismos patogénicos de la enfermedad, incluyendo la neuroinflamación.

2.3.1. Biomarcadores de imagen

Los avances en neuroimagen han permitido estudiar los aspectos funcionales, estructurales y moleculares de la patología de la ELA, los cuales reflejan de forma objetiva la propagación de la patología *in vivo*. Algunas de las anomalías pueden detectarse antes de que se desarrollen los síntomas clínicos, lo que posibilita la intervención terapéutica en casos familiares de ELA [135]. Actualmente existen diferentes técnicas para detectar dichos cambios patológicos, entre las cuales destacan la imagen por resonancia magnética (IRM), espectroscopía por resonancia magnética (ERM), imagen por tensor de difusión (ITD) y tomografía por emisión de positrones (TEP).

Gracias a la técnica de IRM se obtienen imágenes con un buen contraste de los tejidos, lo que permite diferenciar la materia gris de la materia blanca y el LCR. El análisis más básico utiliza las imágenes adquiridas para delinear una región de interés que se sabe que está afectada en la enfermedad y determinar el volumen de esta estructura [135]. En la ELA se han estudiado diferentes regiones del cerebro mediante esta técnica; sin embargo, muchos de los resultados son inconsistentes entre los diversos estudios [136]. No obstante, el grosor de la corteza cerebral parece ser un buen biomarcador para esta enfermedad, ya que se observa una atrofia cortical en regiones tanto motoras como no motoras del cerebro de los pacientes de ELA, que además se agrava conforme progresa la enfermedad [133]. Un estudio reciente propuso un modelo de IRM de diagnóstico, que combina el grosor cortical y la integridad microestructural de regiones anatómicas específicas de ELA, para diferenciar las variantes de ELA de controles sanos y de trastornos con afección de motoneurona inferior [137]. Sin embargo, a día de hoy el análisis volumétrico por sí solo no es lo suficientemente sensible a nivel individual y, en la actualidad, el papel de la IRM convencional en la práctica clínica es principalmente la exclusión de las patologías similares a la ELA como parte del diagnóstico de rutina [133].

La ERM permite explorar el contenido de metabolitos dentro del tejido cerebral *in vivo*. Esta técnica permite distinguir diferentes metabolitos unos de otros, tales como el N-acetil-aspartato (NAA), marcador de la integridad neuronal, la colina (Cho), marcador de la integridad de la membrana, la creatina (Cr), involucrada en el metabolismo energético, y el ácido gamma-

aminobutírico (GABA), un neurotransmisor ampliamente distribuido en las neuronas del córtex cerebral, entre otros [135]. Los estudios realizados sobre el contenido de metabolitos en tejido cerebral han revelado que existen niveles reducidos de NAA y GABA en la corteza motora primaria de los pacientes de ELA [138, 139], así como aumentos de glutamato y glutamina en el tronco encefálico [140]. Sin embargo, la variabilidad metodológica continúa limitando la aplicación diagnóstica de esta técnica en la clínica.

La ITD permite estudiar las diferencias en la direccionalidad de la difusión de las moléculas de agua para evaluar la estructura del tejido y es especialmente adecuada para el estudio de la materia blanca. En ELA se ha observado que existe una reducción de los tractos corticoespinales y del cuerpo calloso [141-144]), que además se correlaciona con medidas clínicas de la progresión de la enfermedad [141, 145-148]. Estos hallazgos junto con otros encontrados mediante ITD demuestran que la estructura de la materia blanca está dañada en la ELA.

La herramienta de TEP se utiliza para observar procesos metabólicos moleculares en el cerebro utilizando radioisótopos emisores de positrones (trazadores) producidos por un ciclotrón. No se han realizado muchos estudios de TEP en ELA, posiblemente debido a que esta técnica, aunque no es invasiva, implica la exposición a radiación ionizante, y también porque el desarrollo de radiotrazadores es un proceso complejo que requiere un ciclotrón y un equipo multidisciplinario especializado [133]. Entre otras cosas, la TEP ha permitido evaluar la activación microglial *in vivo* en los pacientes de ELA, mostrando un mayor activación en córtex premotor, primario, prefrontal y temporal, en tálamo y en bulbo raquídeo, y que además se correlacionó con la progresión de la enfermedad y con otras medidas de daño tisular obtenidas por ITD [73, 149-151].

A pesar de que se han identificado prometedores biomarcadores de neuroimagen, para el diagnóstico, el pronóstico y la progresión de la enfermedad, a día de hoy no se ha hallado ninguno que esté completamente validado y que sea sensible y específico para la ELA [146]. Además, muchos de los biomarcadores propuestos provienen de estudios de cohortes de pacientes seleccionados en centros de referencia especializados, por lo que es necesario que se realicen más estudios multicéntricos para establecer su validez como biomarcador [135].

2.3.2. Biomarcadores electrofisiológicos

A día de hoy se ha descrito un gran número de biomarcadores neurofisiológicos para tratar de ayudar con el diagnóstico temprano, el seguimiento de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento de la ELA. Una de las técnicas empleadas para el estudio de este tipo de marcadores es la estimulación magnética transcraneal (EMT). Se trata de una herramienta no invasiva e indolora que permite evaluar las funciones relacionadas con la motoneurona superior en los pacientes. Esta técnica utiliza un campo magnético pulsado dirigido a un área cortical pequeña e induce la despolarización neuronal en la región para generar un potencial de acción. En ELA, la EMT es útil como marcador de una disfunción de motoneurona superior, y además es capaz de identificar una hiperexcitabilidad cortical en las fases tempranas de la enfermedad [152].

La miografía por impedancia eléctrica (EIM), las pruebas de excitabilidad axonal, y la estimación y el índice del número de unidades motoras (MUNE y MUNIX) son otras herramientas que se han empleado para evaluar la disfunción de motoneurona inferior y que pueden ser especialmente útiles para evaluar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento [152]. En el caso de la EIM, consiste en un conjunto de cuatro electrodos que se colocan en líneas paralelas sobre un músculo o grupo muscular de interés; a continuación, se aplica una pequeña corriente eléctrica de alta frecuencia entre los dos electrodos externos, y los voltajes de superficie resultantes se miden entre los electrodos internos [153]. Los voltajes de superficie medidos reflejan las propiedades conductoras del tejido de estudio. Varios estudios han mostrado que la EIM es bastante sensible a la progresión de la enfermedad [154-156], y además se correlaciona con otras pruebas de medición de la fuerza en los pacientes con ELA [157]. Además, en modelos animales de ELA también se han obtenido resultados similares [158, 159].

Existen diversos métodos para estimar el número de unidades motoras que inervan los músculos, incluidos el MUNE y MUNIX, los cuales pueden considerarse biomarcadores de la degeneración de la motoneurona inferior. Estudios recientes que han utilizado diferentes métodos de MUNE han demostrado que pueden ser útiles para evaluar la progresión de la enfermedad en pacientes con ELA, ya que se ha visto asociada a una disminución lineal progresiva en los recuentos de MUNE [160-164]. De forma similar, MUNIX fue capaz de detectar la progresión de la enfermedad en el músculo en un estadio asintomático [165, 166], incluso

mejorando la sensibilidad de la escala ALSFRS-R (*Amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale-revised*) [163].

Las pruebas de excitabilidad axonal permiten una evaluación *in vivo* y no invasiva de las propiedades biofísicas de los axones periféricos mediante el estudio de los cambios en el potencial de membrana causados por la activación de canales iónicos y bombas de iones electrogénicos [167, 168]. En ambas formas de ELAf y ELAe se ha descrito que existe una hiperexcitabilidad en los axones de las neuronas motoras [169]. Este hallazgo se ha asociado al desarrollo de calambres musculares, fasciculaciones y degeneración de motoneuronas [168, 170, 171], así como a un peor pronóstico en la ELA [172].

En resumen, los biomarcadores neurofisiológicos pueden resultar útiles en el diagnóstico, y también ayudar en el pronóstico y el monitoreo de los efectos de agentes terapéuticos en ensayos clínicos. Sin embargo, es importante destacar que futuros estudios deberían evaluar su potencial en cohortes de pacientes de ELA más amplios que exhiban heterogeneidad del fenotipo clínico [152].

2.3.3. Biomarcadores moleculares

Durante las últimas décadas se han identificado múltiples marcadores moleculares en diversos fluidos biológicos, incluidos el LCR, plasma, suero, e incluso orina y saliva, además de en otros tejidos, principalmente en el músculo esquelético (Figura 5). A diferencia del LCR y el músculo esquelético, los otros fluidos poseen la ventaja de ser fácilmente accesibles y no requieren métodos invasivos para obtenerlos, lo cual es una característica que debe considerarse para poder trasladarlos con mayor facilidad y rapidez a la práctica clínica. Por esta razón, en las últimas décadas, se han realizado numerosos estudios para descubrir nuevos biomarcadores en fluidos que se derivan de diferentes mecanismos patológicos de la ELA [173-178].

Hasta la fecha, los neurofilamentos (NF) son los biomarcadores moleculares más prometedores para la ELA [179]. En concreto, se ha demostrado que los niveles en LCR y sangre de la cadena pesada (NFH) y ligera (NFL) de los neurofilamentos se pueden usar para diferenciar a pacientes con ELA de sujetos sanos y otras enfermedades neurológicas [180]. Aparte de su potencial uso en el diagnóstico, también se ha encontrado una correlación negativa de los

niveles de NFH y NFL en el LCR con la duración de la enfermedad, lo que sugiere a los NF como biomarcadores potenciales tanto para el diagnóstico como para el pronóstico de la ELA [180].

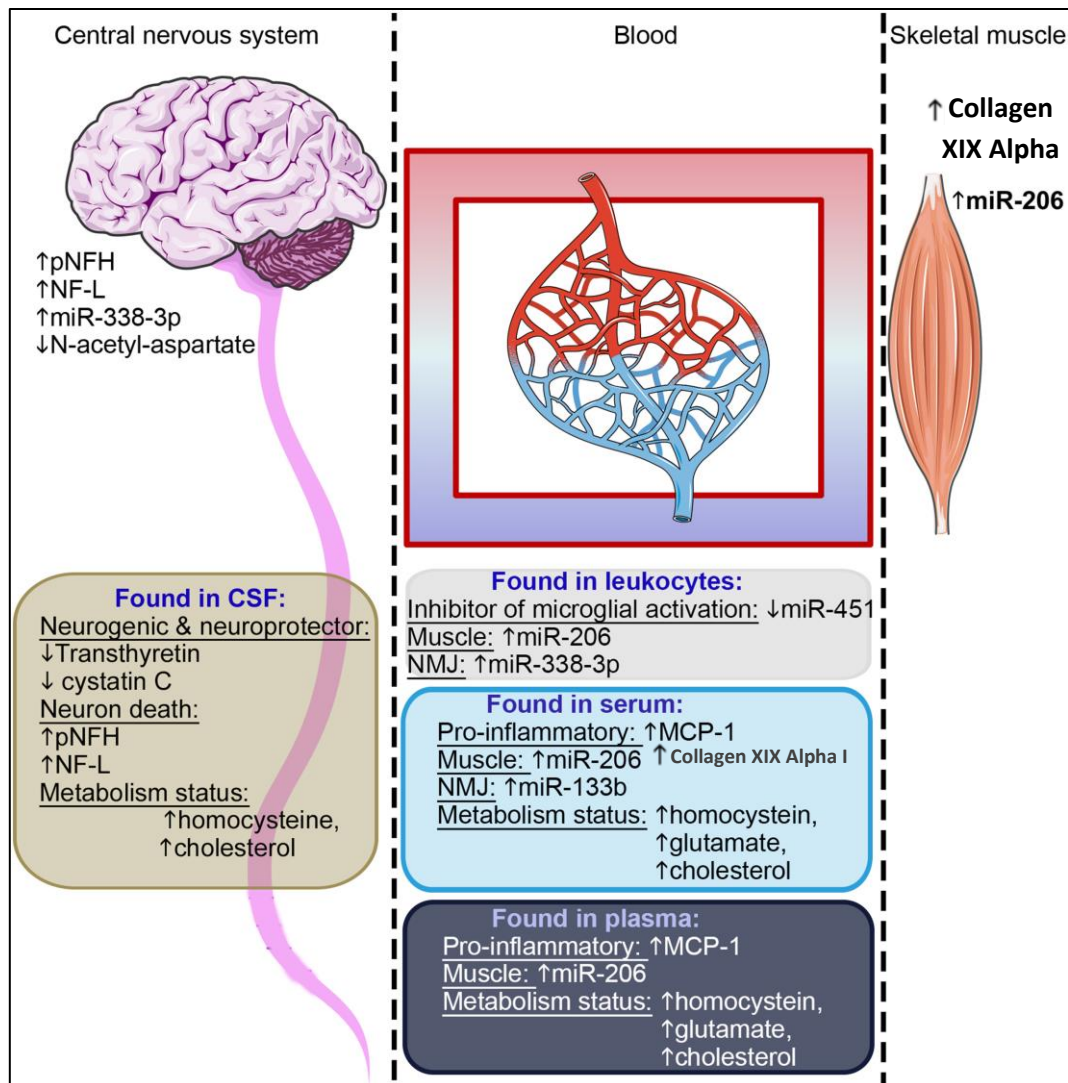


Figura 5. Resumen de los biomarcadores candidatos que se han encontrado consistentemente en los estudios analizados (modificada [15]). *pNFH*: phosphorylated neurofilament heavy chain, *NF L*: neurofilament light chain, *miR*: micro-RNA, *CSF*: cerebrospinal fluid, *NMJ*: neuromuscular junction, *MCP-1*: monocyte chemoattractant protein-1.

Cada vez es mayor el número de estudios relacionados con las alteraciones metabólicas que se dan en pacientes con ELA, estando parte enfocados en identificar biomarcadores relacionados con los cambios metabólicos que se producen en diferentes tejidos, como LCR, sangre y el músculo [181, 182]. Por ejemplo, en plasma de pacientes de ELA, los niveles de

glutamato aumentaron y se correlacionaron con la duración de la enfermedad y con un inicio espinal [183, 184]. Por otro lado, gracias a la espectrometría de masas se han identificado diferentes perfiles metabólicos donde varios aminoácidos han mostrado diferentes niveles en sangre y LCR de pacientes con ELA en comparación con sujetos sanos; estos metabolitos incluyen arginina, lisina, serina y leucina, entre otros [175]. Otros metabolitos que también se han encontrado desregulados en el LCR y la sangre en ELA son la creatina y la creatinina [175, 184], y además han servido de diana terapéutica en un ensayo clínico [185].

Los miRNA son otros potenciales biomarcadores debido principalmente a su notable estabilidad en los fluidos corporales. Varios miRNA se han encontrado alterados en LCR, plasma y suero de pacientes y modelos animales de ELA, como por ejemplo miR206, miR143-3p y miR338-3p [186-189]. Aunque algunos de estos miRNA no son específicos para la ELA, como el miR206, se ha sugerido que su combinación podría considerarse un enfoque más preciso para ayudar con el diagnóstico y el pronóstico de la ELA [189].

En orina, solo se ha descrito un biomarcador con valor pronóstico para la ELA, es el dominio extracelular del receptor de neurotrofina p75 (p75ECD), cuyos niveles mostraron una asociación con la progresión de la enfermedad [190].

2.3.3.1. Biomarcadores de inflamación

De especial interés en esta tesis es hablar sobre los biomarcadores de inflamación que se han descrito hasta ahora en la ELA. Una revisión detallada sobre este tema puede encontrarse en el Anexo I, donde se expone una revisión bibliográfica publicada recientemente. No obstante, en este apartado se resumen y destacan los biomarcadores de inflamación más estudiados en ELA hasta la fecha.

A lo largo de las últimas décadas se han identificado grandes paneles de citoquinas, incluidas numerosas interleuquinas, y células inmunes, como los linfocitos Treg, en LCR, plasma o suero, que se han asociado a la ELA y/o se han correlacionado con una progresión más rápida o más lenta de la enfermedad.

Las citoquinas son proteínas que participan en la comunicación intercelular. Son producidas por varios tipos de células, y controlan diversas funciones fisiológicas, incluida la

inflamación y la respuesta inmune local y sistémica. Dado el papel de la inflamación en la patogenia de la ELA, se han estudiado numerosas citoquinas en sangre y LCR en pacientes y modelos animales de ELA, encontrándose un gran número de ellas desreguladas. Una de las familias de citoquinas que más se ha estudiado son las interleuquinas. Se sintetizan principalmente por los linfocitos T, los macrófagos y las células endoteliales, y ejercen funciones tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. En cuanto a su potencial diagnóstico, la mayoría de interleuquinas desreguladas se han encontrado sobreexpresadas en los casos de ELA con respecto a los controles, incluyendo IL-1Ra, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IL-17A, IL-18 y IL-21 [87, 89, 191-205]. Sin embargo, en algunos trabajos también se han observado resultados contradictorios, ya que encontraron niveles bajos de IL-2, IL-5, IL-6 y IL-10 en pacientes de ELA con respecto a sus controles [193, 197, 206], e incluso otros estudios no observaron ninguna diferencia significativa cuando analizaron IL-2 y IL-6 [207, 208], lo que demuestra la variabilidad de estas moléculas y, por tanto, la dificultad de establecerlas como biomarcadores para el diagnóstico. Por otro lado, también se han correlacionado los niveles de varias interleuquinas con la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, los niveles de IL-4, IL-6 e IL-13 en LCR o sangre de pacientes fueron aumentando con el tiempo, y este incremento se asoció con la progresión de la enfermedad y la escala ALSFRS-R [191, 198, 200], mientras que los niveles de IL-2 en plasma se correlacionaron con una peor supervivencia en pacientes [200].

Aparte de las interleuquinas, también se han observado alteraciones de citoquinas pertenecientes a otras familias en sangre o LCR, por ejemplo la mayoría de los estudios realizados sobre TNF- α han encontrado niveles superiores en sangre y LCR de pacientes con ELA en comparación con individuos sanos en numerosos estudios [194, 199, 200, 203, 204]. En el caso del interferón gamma (IFN- γ) no está tan claro su potencial como biomarcador, puesto que se han encontrado tanto niveles superiores en pacientes de ELA [89, 194, 202, 209] como inferiores [193, 200] en comparación con los individuos sanos. La proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) es una de las citoquinas más estudiadas en la ELA y ha sido propuesta como biomarcador con potencial tanto diagnóstico como pronóstico, ya que se han encontrado tanto en sangre como en LCR niveles superiores en pacientes de ELA en individuos sanos y pacientes con otras enfermedades neurológicas [192-194, 202, 204, 210, 211]. Además, también se ha correlacionado con la progresión de la enfermedad [194, 202, 210]. Otras citoquinas que han mostrado también resultados similares en varios estudios han sido la proteína inflamatoria

de macrófagos 1 α (MIP-1 α) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) [193, 194, 202-204, 212, 213].

Como ya se ha comentado anteriormente, los linfocitos Treg están considerados un biomarcador prometedor además de una potencial diana terapéutica en la ELA. Estas células suprimen varios componentes de la respuesta inmune, incluida la producción de citoquinas y la proliferación de linfocitos T. Se ha descrito tanto su papel diagnóstico, ya que su número parece estar disminuido en los pacientes de ELA [91], como su papel pronóstico, puesto que la cantidad de Treg se ha correlacionado de forma inversa con el ratio de progresión de la enfermedad [91]. Además, también se ha encontrado que los Tregs de pacientes con ELA tenían una capacidad reducida para suprimir la actividad de los linfocitos T respondedores, y que la disfunción de los Treg se correlacionaba con la tasa de progresión de la enfermedad [90].

Otros marcadores inflamatorios han mostrado estar alterados en ELA, como la proteína C reactiva (CRP), cuyos niveles en sangre se encontraron aumentados en ELA [214]; además, otro trabajo correlacionó la CRP con la escala ALSFRS-R y la supervivencia [215]. De forma similar, la quitotriosidasa, expresada por los macrófagos activos en tejidos, aumentó en sangre de pacientes de ELA en comparación con los individuos sanos, y fue mayor en aquellos que presentaron una progresión más rápida de la enfermedad [216]. Sin embargo, otro estudio no fue capaz de corroborar estos resultados, no encontrando diferencia alguna en suero de los pacientes y sujetos sanos, aunque sí que correlacionaron los niveles de quitotriosidasa en LCR con la severidad de la enfermedad [217].

Como conclusión sobre los biomarcadores en la ELA, actualmente se sabe que la ELA es una enfermedad compleja, en la cual están involucrados múltiples procesos patológicos, como la disfunción neuronal, agregados proteicos y neuroinflamación, en diferentes etapas de la enfermedad. Por esta razón, se dan numerosos cambios en la sangre, el LCR, la electrofisiología y la neuroimagen que pueden monitorizarse simultáneamente, proporcionando una imagen más precisa de la enfermedad a lo largo del tiempo. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible dar con un biomarcador definitivo que por sí solo sea lo suficientemente sensible y específico para el diagnóstico o el pronóstico de la ELA. Un mejor abordaje para la búsqueda de biomarcadores podría ser buscar una combinación de biomarcadores de diferentes tipos con el

fin de proporcionar una mejor comprensión de esta patología [218]. En esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en el estudio de diversas citoquinas pro- y anti-inflamatorias para ahondar en su potencial naturaleza como biomarcadores diagnóstico y/o pronóstico, y como dianas terapéuticas en la ELA.

OBJETIVOS

3

El objetivo general planteado en la presente memoria de Tesis Doctoral es estudiar la implicación de la inflamación en la Esclerosis Lateral Amiotrófica mediante la identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas que sean en un futuro trasladables a la práctica clínica.

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

1.- Identificar biomarcadores diagnóstico y/o pronóstico basados en proteómica de citoquinas en plasma de animales modelo de ELA

1.1. Identificar biomarcadores diagnóstico basados en proteómica de citoquinas en plasma de animales SOD1G93A de 40 días de edad (carentes de sintomatología visible) respecto a sus controles sanos.

1.2. Estudiar la capacidad pronóstica de los biomarcadores seleccionados en el objetivo anterior mediante el estudio de correlación de los niveles de expresión proteicos con la supervivencia de los animales modelos de ELA.

2. Estudiar la expresión proteica de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 a lo largo de la enfermedad en el modelo animal SOD1G93A en tejidos afectados por la enfermedad, y analizar su papel como biomarcador diagnóstico en sangre de pacientes de ELA.

3.- Comprobar la modificación de los niveles de expresión proteica de los biomarcadores identificados en los objetivos anteriores tras la aplicación del tratamiento con el fragmento C de la toxina tetánica para conocer su capacidad predictiva.

4.- Estudiar el efecto de la modulación de la inflamación en la supervivencia de animales SOD1G93A mediante la reducción de los niveles génicos de granzima A, implicada en procesos pro-inflamatorios.

MATERIALES Y MÉTODOS



Los materiales y métodos empleados para la realización de esta tesis doctoral están descritos convenientemente en cada capítulo del apartado quinto de “Resultados y Discusión”. No obstante, se ha considerado oportuno realizar una descripción general algo más detallada de la metodología seguida para la obtención de los resultados.

4.1. MODELO ANIMAL DE ELA

4.1.1. Aspectos generales

El modelo animal empleado ha sido el ratón transgénico SOD1G93A de alta copia, el cual sobreexpresa la enzima superóxido dismutasa 1 humana (hSOD1) mutada, con un cambio de glicina por alanina en el codón 93. Actualmente se considera uno de los mejores modelos murinos de ELA, ya que desarrolla unas características fenotípicas similares a las que se observan en la ELA [14]. En concreto, en los trabajos de esta tesis se utilizó el ratón transgénico de la cepa B6SJL (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J), adquirido en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) (número de stock 002726).

Para la obtención de los ratones transgénicos y mantenimiento de la colonia se cruzaron ratones machos transgénicos heterocigotos con hembras C57BL/6J x SJL/J F1, compradas a Janvier Labs (Saint-Berthevin Cedex, France). De esta forma, se obtienen ratones transgénicos que sobreexpresan la hSOD1 y ratones homocigotos sin el transgén, siendo estos últimos los empleados como controles o *wildtype* (WT). Para el diseño de los experimentos se tuvo en cuenta que en cada grupo de animales hubiera hermanos de camada y, por otra parte, que el número de machos y hembras estuviera repartido de forma igualitaria.

Los animales se alojaron en el Servicio de Animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón, recibiendo agua y comida *ad libitum*, y bajo un ciclo estándar de luz y oscuridad de 12 horas en unas condiciones ambientales de temperatura (21-23°C) y humedad relativa (55%) controladas. Las condiciones sanitarias fueron controladas mediante análisis bacteriológicos, parasitológicos y serológicos. El cuidado y uso de los animales se llevaron a cabo siguiendo las directrices del RD53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, y que se corresponde con la Directiva de la Unión Europea 2010/63. Además, todos los procedimientos

llevados a cabo han sido aprobados por el Comité Ético para Animales de Experimentación de la Universidad de Zaragoza (PI29/13, PI14/18).

4.1.2. Genotipado

El genotipado de los ratones para identificar aquellos que expresan la *hSOD1* se realizó siguiendo el protocolo de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) [219]. Dicho protocolo se basa en la detección de la *hSOD1* mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA de muestras de tejido de los ratones. EL DNA se extrajo mediante la lisis del tejido con NaOH (50mM) a 98°C durante 1 hora en un termobloque; tras neutralizarlo con el tampón Tris 1M, se centrifugó a 14000 RPM durante 6 minutos y se recogió el sobrenadante que contiene el DNA. A continuación, se realizó la PCR, con la mezcla de sus componentes descrita en la tabla 5, para amplificar simultáneamente fragmentos de dos genes, *hSOD1* y *IL-2*, siendo este último el control de la amplificación. Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan en la tabla 6. Después, se visualizaron los productos amplificados en un gel de agarosa al 2% con tinción de Gel Green®. Los animales WT presentaron una banda de 324 pb (*IL-2*), mientras que los transgénicos mostraron esa misma banda y una adicional de 236 pb, que se corresponde con la amplificación del gen *hSOD1*. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 3 minutos (desnaturalización inicial), y 30 ciclos de 95, 60 y 72 °C de 30 segundos en cada temperatura, y finalmente se conservó la muestra a 4 °C.

Tabla 5. Mezcla de los componentes para la realización de la PCR.

COMPONENTES	VOLUMEN (µl)
H ₂ O	12
dNTPS 1.25 mM	3,2
BUFFER 10X	2
MgCl ₂ 100 mM	0,4
OIMR42 20 µM	0,4
OIMR43 20 µM	0,4
OIMR113 20 µM	0,2
OIMR114 20 µM	0,2
Taq (azul)	0,2
DNA 100 ng	1
Volumen final	20 µl

H₂O: agua, dNTPs: deoxynucleotide triphosphates, MgCl₂: cloruro de magnesio.

Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR del genotipado.

GEN	CEBADOR	SECUENCIA
<i>IL-2</i>	OIMR042	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT
	OIMR043	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C
<i>hSOD1</i>	OIMR0113	CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA
	OIMR0114	CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA

IL-2: interleuquina 2, *hSOD1*: superóxido dismutasa 1 humana.

4.1.3. Generación del modelo animal transgénico SOD1G93A y knock-out de granzima A

Para la obtención de ratones SOD1G93A y knock-out de granzima A (*gzmA*) se cruzaron machos transgénicos del modelo animal previamente descrito (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J), con hembras C57BL/6 deficientes en *gzmA*, cedidas por Markus Simon (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg). El genotipado para detectar la *hSOD1* se realizó de la forma descrita anteriormente, mientras que la identificación de los tres genotipos de *gzmA* se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita según Simon y colaboradores [220].

Se realizaron dos diseños de cruces que están representados en la figura 6. En primer lugar, se cruzaron machos SOD1G93A (*gzmA*^{+/+}) con hembras C57BL/6 deficientes en *gzmA* (*gzmA*^{-/-}), obteniendo ratones SOD1G93A heterocigotos (*gzmA*^{+/-}). En el primer diseño de los cruces, estos ratones se volvieron a cruzar con hembras C57BL/6 *gzmA*^{-/-} para obtener ratones SOD1G93A *gzmA*^{+/-} y *gzmA*^{-/-} hermanos de camada con el mismo fondo genético (Figura 6A). El segundo esquema de cruces se desarrolló con el objetivo de obtener ratones SOD1G93A con el mismo fondo genético y que presentaran los tres posibles genotipos de *gzmA* (*gzmA*^{+/+}, *gzmA*^{+/-} y *gzmA*^{-/-}). Para ello se cruzaron los ratones SOD1G93A heterocigotos (*gzmA*^{+/-}) con ellos mismos, evitando parentescos, de forma que pudimos obtener los tres genotipos de granzima en el mismo fondo genético (Figura 6B).

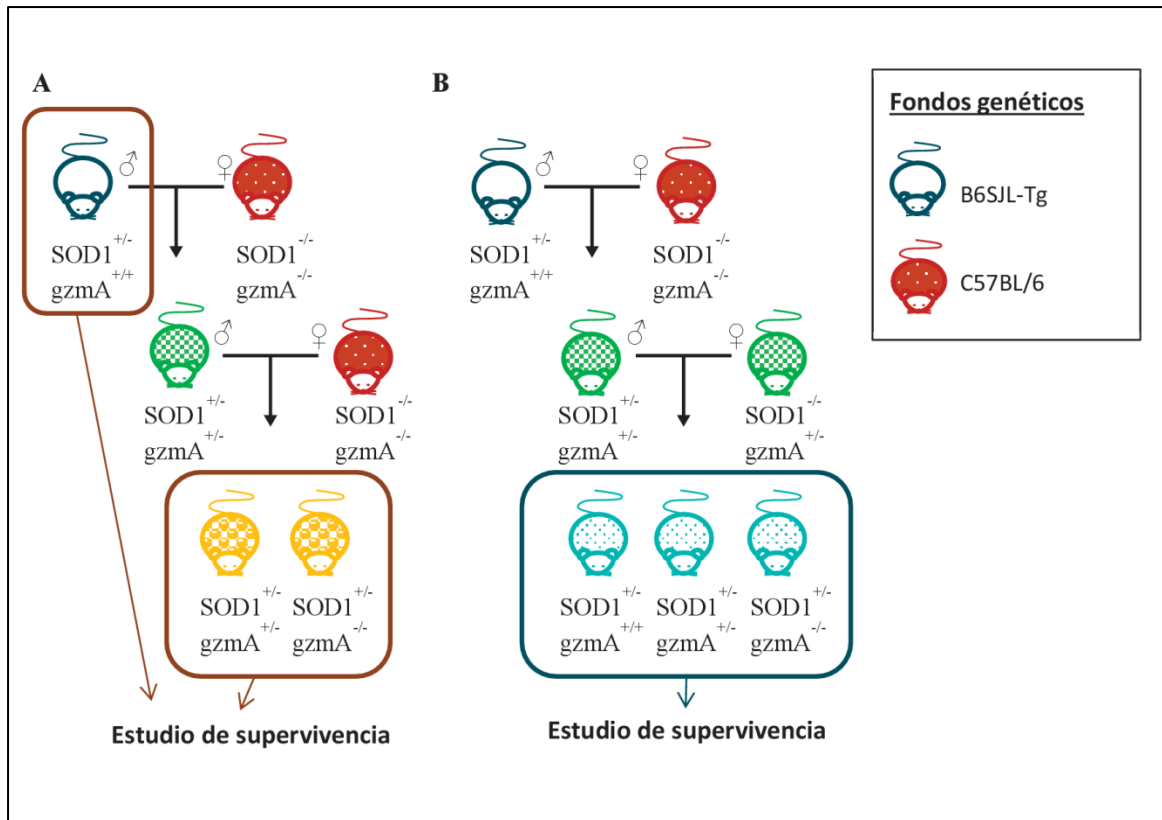


Figura 6. Diseño de los cruces y estudios de supervivencia de los modelos animales transgénicos SOD1G93A y knock-out de granzima A.

4.1.4. Evaluación de la supervivencia de los animales transgénicos

A lo largo de esta tesis se han llevado a cabo diversos estudios de supervivencia con fines diferentes. En primer lugar, se analizó la supervivencia de un grupo total de 87 ratones SOD1G93A con el fin de poder seleccionar aquellos ratones que mostraron una mayor y una menor supervivencia, y poder correlacionar dichos datos con las concentraciones de varias citoquinas medidas en sangre con el fin de evaluar su papel potencial como biomarcadores pronóstico. Por otro lado, también se analizó la supervivencia de los ratones SOD1G93A con una deficiencia total, parcial o nula de gzmA para evaluar el efecto de la supresión o reducción de este gen en la evolución de la enfermedad.

Los estudios de supervivencia consistieron en monitorizar individualmente cada ratón de forma que se controlaba su progresión con una frecuencia de tres veces por semana desde los 100 días de edad hasta su punto final. El punto final humanitario (PFH) de este modelo animal está establecido como la pérdida del reflejo de posicionarse en decúbito prono por sí mismo,

durante más de treinta segundos, tras haber colocado al animal previamente en decúbito lateral. Dado que cada animal presenta un punto final distinto, los estudios de correlación previamente mencionados nos permiten establecer si los perfiles de expresión de los marcadores moleculares que evaluamos pueden influir en la supervivencia de los animales.

4.2. PACIENTES

Las muestras de sangre utilizadas en este trabajo proceden del Centro Clínico NEMO (Milán, Italia). En total se analizaron 20 muestras de individuos control, 20 muestras de individuos con otras neuropatías (ONP) (distrofias musculares, síndrome extrapiramidal, y diversas miotonías) y 20 muestras de pacientes de ELA. Las características clínicas de los pacientes se detallan en la tabla 7. Todos los procedimientos llevados a cabo con estas muestras fueron aprobados por Además, todos los procedimientos llevados a cabo han sido aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón (CEICA) (PI18/078)

Tabla 7. Características clínicas y generales de los pacientes incluidos en el estudio.

Características de los pacientes	Pacientes de ELA (n=20)	Pacientes de ONP (n=20)	Controles sanos (n=20)
Género (n)	13 varones 7 mujeres	12 varones 8 mujeres	7 varones 13 mujeres
Edad de comienzo de los síntomas, años (media ± DE)	64 ± 8.43		
Duración de la enfermedad, meses (media ± DE)	26 ± 17.56		
Edad en la toma de muestras, años (media ± DE)	66 ± 8.67	56 ± 12.08	61 ± 9.56
Lugar de inicio de los síntomas (n de pacientes)			
<i>Bulbar</i>	4		
<i>Extremidades superiores</i>	5		
<i>Extremidades inferiores</i>	8		
<i>Generalizado</i>	2		
<i>Respiratorio</i>	1		

Todos los pacientes de ELA mostraron en el momento de la toma de muestra un valor de 48 en la escala ALSFRS-r y presentaron mutaciones en los siguientes genes: SOD1, FUS, TDP43 y C9ORF72
 ELA: esclerosis lateral amiotrófica, ONP: otras neuropatías, DE: desviación estándar.

4.3. TRATAMIENTO EXPERIMENTAL CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE TTC

El fragmento C-terminal de la toxina tetánica (TTC) ha mostrado en estudios previos su papel neuroprotector en animales modelo de ELA, en los cuales se observó una mejoría de la supervivencia de los mismos, además de otros efectos positivos [221]. En este experimento se utilizó proteína recombinante TTC, cedida por el Dr. José Aguilera (UAB, CIBERNED, Barcelona, España). El tratamiento con TTC se aplicó en el modelo animal murino SOD1G93A, en concreto se emplearon 12 animales WT y 12 SOD1G93A, hermanos de camada y con sexos balanceados. La inyección se realizó con jeringuillas de insulina de 0,3ml (BD) por vía intramuscular en las cuatro extremidades, desde los 55 días de edad hasta los 110 días, con una frecuencia semanal, siendo la dosis de 1 µg de TTC por ratón (Figura 7). De estos ratones se obtuvieron muestras seriadas de plasma a los 60, 90 y 110 días de edad, además de otros tejidos a P110: médula espinal, músculo extensor digital largo (EDL) y músculo sóleo (SOL). La metodología seguida para la extracción de las muestras biológicas se describe en el siguiente apartado.

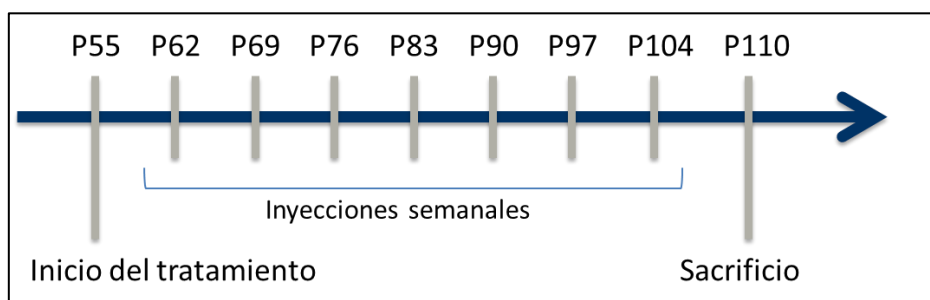


Figura 7. Cronología del tratamiento con TTC. El tratamiento se aplicó de forma semanal, comenzando a la edad de 55 días (P55) hasta su sacrificio a 110 días de edad (P110).

En las muestras de plasma se analizaron los niveles proteicos de eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, MIP-1 α mediante un ELISA y un análisis multiplex ProcartaPlex[®] Multiplex Immunoassay (Affymetrix eBioscience). Posteriormente, en los tejidos extraídos (médula espinal, EDL y SOL) se analizó la expresión proteica de IL-6 y otras proteínas implicadas en el mecanismo del inflammasoma NLRP3 mediante la técnica de western blotting.

4.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

4.4.1. Extracción de sangre del modelo animal SOD1G93A

4.4.1.1. Obtención de sangre de la vena submandibular

La extracción de sangre de forma seriada de un mismo ratón a lo largo del tiempo nos ha permitido poder estudiar la variación de diferentes citoquinas conforme avanzaba la enfermedad en un mismo individuo, posibilitando de esta manera la identificación de potenciales biomarcadores pronóstico. Para los estudios que se han llevado a cabo en esta tesis se eligió la sangre seriada procedente de la vena submandibular, ya que de ella se obtiene un volumen adecuado para su posterior análisis en inmunoensayos, a diferencia por ejemplo de la cantidad de sangre que se extrae de la vena caudal.

La sangre se extrajo de la vena submandibular con ayuda de una lanceta y se recogió en un tubo de 0,5 ml con anticoagulante EDTA (BD Biosciences, USA). A continuación, la sangre se mezcló con el EDTA para evitar su coagulación y se centrifugó, dentro de los primeros 30 minutos tras la extracción, durante 10 minutos a 3000 RPM a 4°C. Finalmente se recogió el sobrenadante, el plasma, y se congeló inmediatamente en hielo seco hasta su almacenamiento a -80 °C.

Las muestras seriadas de sangre submandibular se recogieron en dos estadios de la enfermedad: sintomático temprano (P60) y sintomático tardío (P90).

4.4.1.2. Obtención de sangre cardiaca

Otra forma de obtener un volumen considerable de sangre de ratón es por medio de la punción intracardiaca. Es por ello que se eligió este método en los experimentos en los que se sacrificaba al animal. Para ello, los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂ y se extrajo la sangre con una jeringuilla de 1 ml. A continuación, la sangre se depositó en un tubo de 0,5 ml con anticoagulante EDTA (BD Biosciences, USA), y se siguió la misma metodología del apartado anterior. Los estadios en los que se obtuvieron estas muestras fueron, por un lado, en la etapa pre-sintomática (P40), para detectar cambios de niveles de citoquinas en los animales

SOD1G93A con respecto a los WT en una etapa temprana de la enfermedad; por otro lado, en la etapa tardía de la enfermedad (P110 ó PFH), coincidiendo con el sacrificio del animal que se realizó para recoger otros tejidos.

4.4.2. Extracción de otros tejidos del modelo animal SOD1G93A

Además de la sangre, se recogieron otros tejidos para los posteriores estudios de expresión proteica y génica. Los tejidos escogidos son dos de los más afectados por la enfermedad: la médula espinal y el músculo esquelético. En cuanto a este último, se extrajeron diferentes tipos de músculo esquelético en función de su composición de fibras. Por un lado, se escogió el cuádriceps, compuesto por fibras musculares rápidas y lentas, para estudiar los perfiles génicos en un músculo de composición heterogénea. Por otro lado, se seleccionó el EDL, compuesto mayoritariamente de fibras musculares glucolíticas rápidas, y más afectado por la enfermedad, y el SOL, con predominio de fibras oxidativas lentas, menos afectado en el modelo, para comparar los perfiles proteicos dependiendo de la afección que presentan estos músculos.

Para la obtención de estos tejidos, a los animales se les aplicó la eutanasia en una cámara de CO₂ y a continuación se diseccionaron los tejidos, que fueron congelados rápidamente en hielo seco y almacenados a -80 °C hasta su posterior uso.

4.4.3. Obtención de sangre de pacientes

Las muestras de sangre de pacientes se recibieron congeladas en tubos PAXgene™ (BD Biosciences, USA). Estas muestras fueron almacenadas a -80° C hasta su posterior uso. Los tubos PAXgene están especializados para la conservación de la sangre total, y la estabilización y purificación del RNA intracelular, de manera que permite una precisa detección y cuantificación de los transcritos génicos.

4.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

4.5.1. Inmunoensayos

Las muestras de sangre de pacientes y de plasma de los ratones SOD1G93A a las edades de P40, P60, P90, P110 y PFH se utilizaron para estudiar la expresión proteica de un panel de mediadores inflamatorios mediante varios tipos de inmunoensayos que se detallan a continuación.

4.5.1.1. Array

Se analizó en el plasma de 6 ratones WT (3 machos y 3 hembras) y 6 ratones SOD1G93A (3 machos y 3 hembras) de 40 días de edad un panel de 97 citoquinas mediante un array (Mouse Cytokine Array G6, Raybiotech, Inc.). El objetivo era realizar un estudio de proteómica de citoquinas en plasma de animales SOD1G93A de 40 días, sin sintomatología visible, respecto a sus controles sanos con el fin de poder identificar posibles biomarcadores de carácter diagnóstico. El array se realizó en el servicio ofrecido por la compañía Raybiotech, Inc.

4.5.1.2. Ensayos multiplex y quantibody

De las 16 citoquinas que se encontraron desreguladas en el array, se estudió su capacidad pronóstica en las muestras seriadas de plasma a las edades de P60, P90 y PFH. Con el fin de poder correlacionar la longevidad de los animales con los niveles proteicos de las citoquinas, se eligieron las muestras de los 16 animales menos longevos (de 112 a 126 días de edad) y los 16 que resultaron ser los más longevos (de 133 a 150 días de edad), teniendo en cuenta que los sexos estuvieran balanceados en ambos grupos.

El análisis de las 16 citoquinas se realizó mediante dos inmunoensayos: multiplex y quantibody. En el multiplex (ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay, Affymetrix eBioscience), se midieron los niveles proteicos de 7 citoquinas: eotaxina-1, interleuquina (IL)-2, IL-6, IL-10, IL-13, proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α), y ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL). El resto de las citoquinas se analizó mediante un quantibody (Quantibody RMouse Cytokine Array, Raybiotech, Inc.): ligando de quimioquina 21 (CCL21 o

6Ckine), kinasa similar al receptor de activina 1 (ALK-1), miembro 8 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNFSF8 o CD30 L), galectina-1, miembro 18 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF18 o GITR), receptor de la interleuquina 17B (IL-17B R), proteína inflamatoria de macrófagos 3 beta (MIP-3 β), miembro 19 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF19 o TROY), y factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGF-D).

Las citoquinas que se correlacionaron con la longevidad de los animales fueron estudiadas en muestras de plasma extraídas a P110 de los animales que recibieron el tratamiento con TTC con el objetivo de evaluar el efecto de esta molécula con potencial terapéutico neuroprotector en la ELA sobre dichas citoquinas. De nuevo, para ello se realizó un ensayo multiplex (ProcartaPlex[®] Multiplex Immunoassay, Affymetrix eBioscience) donde se estudiaron las siguientes citoquinas: eotaxina-1, IL-2, IL-6 y MIP-1 α . Las muestras empleadas fueron de 5 ratones controles (SOD1G93A tratados con PBS) y 6 ratones SOD1G93A tratados con TTC.

4.5.1.3. ELISA

Otra de las citoquinas que se encontró correlacionada con la longevidad en el primer ensayo multiplex fue la galectina-1. En el estudio del tratamiento con TTC, debido a que no se pudo diseñar un análisis multiplex que incluyera esta citoquina junto con el resto de proteínas, su expresión se analizó de forma individual mediante un ELISA (Boster Biological Technology). En este caso, las muestras empleadas fueron de 11 ratones controles (SOD1G93A tratados con PBS) y 11 ratones SOD1G93A tratados con TTC.

Por último, seleccionamos una citoquina, la IL-6, en base a su correlación con la longevidad y su desregulación en varios tejidos además del plasma, para estudiarla en muestras de sangre de pacientes de ELA. El estudio incluyó muestras de 20 pacientes de ELA, 20 pacientes con otras enfermedades neurológicas y 20 sujetos sanos (Tabla 7). El análisis se realizó mediante un ELISA específico para IL-6 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc). El protocolo seguido fue el indicado por la casa comercial.

4.5.2. Western blot

4.5.2.1. Extracción y cuantificación proteica.

Los tejidos previamente congelados de médula espinal, EDL y SOL del modelo animal SOD1G93A se pulverizaron en un aparato, Tissue Lyser LT (Qiagen), que permitió lisar el tejido hasta quedar resuspendido en el tampón RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*) con antiproteasas (SC-24948, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA). Después, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C para obtener finalmente la fracción proteica de la muestra.

La cantidad total de proteína se cuantificó mediante el método del ácido bicinconínico o BCA y se midió la absorbancia de las muestras a 562 nm en un espectrofotómetro (Infinite F200, Tecan Ibérica Instrumentación).

4.5.2.2. Electroforesis e inmunodetección.

El siguiente paso fue la realización de una electroforesis con el fin de separar las proteínas en función de su tamaño. Para ello, en primer lugar las muestras se desnaturalizaron junto con el tampón Laemli 4x a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se cargó un total de 30 µg de proteína de cada muestra en un gel de acrilamida al 5-10%, cuyas composiciones se describen en la tabla 8. Tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham Hybond™-P, GE).

Tabla 8. Composición de los geles de acrilamida utilizados para el Western Blot.

	Gel separador (10%)	Gel concentrador (5%)
Agua mQ (ml)	4.9	6.15
Buffer separador 4% (ml)	2.5	2.5
Acrilamida (ml)	2.5	1.25
SDS 10% (ml)	0.1	0.1
APS 10% (µl)	30	30
TEMED (µl)	15	15

mQ: milli Q o ultrapura, SDS: dodecilsulfato sódico, APS: ammonium persulfate, TEMED: tetramethylethylenediamine.

Para llevar a cabo la inmunodetección de las proteínas, primero se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana con una solución de TTBS 1x con BSA al 5%, colocando la membrana en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se incubó la membrana en agitación con los anticuerpos primarios específicos para cada proteína durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios se prepararon en la dilución adecuada para cada proteína en la solución de bloqueo anteriormente descrita. A continuación, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario unido a la enzima HRP (*horseradish peroxidase*), en agitación, durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados están detallados en la tabla 9. Para finalizar, se llevó a cabo la inmunodetección mediante la adición a la membrana de un sustrato quimioluminiscente, Immobilon Crescendo Western HRP Substrate (Millipore) y visualizando el resultado en el aparato Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 system. Los resultados obtenidos se normalizaron con proteínas *housekeeping*, en particular se emplearon beta actina (ACTB) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (PK-AB718-3781, Promokine). Finalmente, el análisis se realizó mediante densitometría de las bandas obtenidas utilizando el programa informático AlphaEase FC software (Bonsai Technologies Group, S.A., Madrid, España).

Tabla 9. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el Western Blot.

Anticuerpo	Peso molecular (kDa)	Referencia	Dilución	Tejido
ACTB	42	PA1-183, Thermo Fisher Scientific	1:1000	Médula espinal, EDL, SOL
Caspasa-1	20, 45	sc-1218-R, Santa Cruz Biotechnology	1:250	Médula espinal, EDL, SOL
GAPDH	37	PK-AB718-3781, Promokine	1:1000	EDL, SOL
IL-1 β	31	sc-7884, Santa Cruz Biotechnology	1:250	Médula espinal, EDL, SOL
IL-6	26	PK-AB815-61632M, Promokine	1:1000	Médula espinal, EDL, SOL
NLRP3	106	sc-66846, Santa Cruz Biotechnology	1:250	Médula espinal, EDL, SOL
goat anti-Rabbit IgG	-	31466, Thermo Fisher Scientific	1:3000	Médula espinal, EDL, SOL

ACTB: beta actina, GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, IL: interleuquina, NLRP3: nod-like receptor family pyrin domain containing 3.

La composición de todas las soluciones empleadas para la realización del Western Blot se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Composición de las soluciones utilizadas para la realización del Western Blot.

Solución	Composición
Buffer de electroforesis 10x	30.27 g de Tris-base, 144.27 g de glicina, 10 g de SDS, 1 l H ₂ Od, pH 8.3
Buffer de electroforesis 1x	100 ml de buffer electroforesis 10x, 900 ml H ₂ Od
Buffer de gel separador 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 Od
Tampón Laemli 4x	2.5 ml de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 2.5 ml de SDS 10%, 2.5ml de 2-Mercaptoetanol, 2.5ml 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 Od, pH 7.5
TTBS 1x	100 ml de TBS 10x, 900 ml de H ₂ Od, 1 ml de Tween-20
Tris-glicina 20x	29.07 g de Tris-base, 144.13 g de glicina, 1 l de H ₂ Od
Stripping	0.985 g de Tris-HCl pH 6.7, 2 g de SDS, 100 ml H ₂ Od

H₂Od: agua destilada, SDS: dodecilsulfato sódico, TBS: Tris-buffered saline, NaCl: cloruro sódico, TTBS: Tween-Tris-buffered saline.

4.6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

4.6.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA de la médula espinal y el cuádriceps del modelo animal SOD1G93A se realizó siguiendo la misma metodología para ambos. En primer lugar, el tejido almacenado y congelado a -80°C se pulverizó en un aparato, Tissue Lyser LT (Qiagen), que permitió lisar el tejido hasta quedar homogeneizado con el reactivo QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). A continuación, el RNA se extrajo empleando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (R2052, Zymo Research Corp.), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

La extracción de RNA de la sangre procedente de pacientes de ELA, pacientes ONP e individuos sanos o control se llevó a cabo mediante el kit PAXgene Blood RNA (PreAnalytiX, 8634

Hombrechtikon, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. El estudio incluyó muestras de 20 pacientes de ELA, 20 pacientes ONP y 20 sujetos sanos (Tabla 7).

4.6.2. Retrotranscripción (RT-PCR)

Una vez realizada la extracción de RNA, se comprobó su calidad y se cuantificó la concentración de RNA en cada muestra mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop NS-1000 (Thermo Scientific). Para la síntesis del ADN complementario (cDNA), se partió de 200 ng de RNA de cada muestra y se siguió el protocolo del kit empleado, qScript™ cDNA SuperMix (Quanta BioScience, Inc.). El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.6.3. PCR a tiempo real (qPCR)

En el cDNA se estudió la expresión de una serie de genes recogidos en la tabla 11 mediante PCR a tiempo real. Esta técnica permite cuantificar el cDNA del gen de interés en una determinada muestra. Para ello, se utilizaron sondas TaqMan™ (Applied Biosystems Inc.) específicas para cada gen. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 5 µL, compuesto por 2.5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.), 0.5 µL de la sonda TaqMan para cada gen y 2 µL de cDNA diluido 1:10 con agua DEPC. Las reacciones se hicieron mediante el aparato Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc.). Los resultados obtenidos se normalizaron con los genes *housekeeping*, *Gapdh*, *Hprt* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) y *Tbp* (*TATA-binding protein*), y se analizaron mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ [222].

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos y la elaboración de gráficos se llevaron a cabo a través de los programas informáticos SPSS (version 20, IBM, Armonk, NY) y GraphPad Prism Software (version 5, La Jolla, CA). Los niveles de significación se establecieron cuando el p-valor fue menor de 0.05.

En cuanto a las pruebas estadísticas empleadas, en primer lugar se comprobó la normalidad de los datos mediante las pruebas de Shapiro-wilk o Kolgomorov-Smirnov, en

función del tamaño muestral. Por otro lado, para comparar las medias de variables cuantitativas se utilizaron las pruebas t-student o U de Mann-Whitney, y t-student pareado o Wilcoxon cuando las muestras eran pareadas. En cuanto a las correlaciones entre las concentraciones de citoquinas y la supervivencia, se estudiaron mediante correlaciones de Pearson o Spearman. En relación a los estudios de supervivencia, se emplearon el análisis de Kaplan-Meier y la prueba de Log-Rank. Por último, para estudiar posibles asociaciones entre variables cualitativas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado.

Tabla 11. Relación de genes empleados en estudio de la expresión génica en diferentes tejidos y sujetos.

Símbolo del gen	Sonda TaqMan	Sujeto	Tejido
<i>Gapdh</i>	Hs99999905_m1	Pacientes	Plasma
<i>Gapdh</i>	4352932E, Applied Biosystems Inc.	Modelo animal SOD1G93A	Médula espinal Cuádriceps
<i>Gsr</i>	Mm00833903_m1, Applied Biosystems Inc.	Modelo animal SOD1G93A	Médula espinal Cuádriceps
<i>Gzma</i>	Mm01304452_m1, Applied Biosystems Inc.	Modelo animal SOD1G93A	Médula espinal Cuádriceps
<i>Hprt</i>	Hs02800695_m1	Pacientes	Plasma
<i>IL18</i>	Mm00434228_m1, Applied Biosystems Inc.	Modelo animal SOD1G93A	Médula espinal Cuádriceps
<i>IL6</i>	Hs00985639_m1, Applied Biosystems Inc.	Pacientes	Plasma
<i>IL6</i>	Mm00446190_m1, Applied Biosystems Inc.	Modelo animal SOD1G93A	Médula espinal Cuádriceps
<i>Mt2</i>	Mm00809556_s1, Applied Biosystems Inc.	Modelo animal SOD1G93A	Médula espinal Cuádriceps
<i>Tbp</i>	Hs00427620_m1	Pacientes	Plasma

Gapdh: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, *Gsr*: glutathione reductase, *Gzma*: granzima A, *Hprt*: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, *IL*: interleuquina, *Mt2*: Metallothionein-2, *Tbp*: TATA-binding protein.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se corresponden con el objetivo general planteado que es estudiar la implicación de la inflamación en la Esclerosis Lateral Amiotrófica mediante la identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas que sean en un futuro trasladables a la práctica clínica.

La presentación de estos resultados y la discusión de los mismos se realizará en forma de capítulos, los cuales se corresponden con manuscritos publicados, enviados para su revisión o en preparación.

Con el fin de identificar posibles marcadores de ayuda al diagnóstico en la enfermedad, en un primer momento se estudió un panel de 97 citoquinas en plasma de animales SOD1G93A de 40 días de edad (sin sintomatología visible) y sus controles sanos, wildtype (WT). Los resultados mostraron 16 citoquinas desreguladas en los animales SOD1G93A con respecto a sus controles: 6Ckine, ALK-1, CD30 L, Eotaxin-1, Galectin-1, GITR, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17B R, MIP-1 α , MIP-3 β , TRANCE, TROY, VEGF-D. Este hallazgo sugirió que ya existía una alteración del sistema inmune en una etapa muy temprana de la enfermedad. A continuación, se investigó la capacidad pronóstica de dichos marcadores mediante el estudio de correlación de la variación de los niveles de expresión proteicos a lo largo de la enfermedad con la supervivencia de los animales modelo. Para ello, se estudió la expresión proteica en plasma de estas 16 citoquinas de forma seriada en distintos estadios de la enfermedad (P40, P60, P90 y punto final) en animales muy longevos y poco longevos con el fin de identificar aquellas citoquinas con potencial pronóstico que se correlacionaran o no con la longevidad. De estas 16 citoquinas analizadas, en los animales menos longevos se encontraron aumentados los niveles de ALK-1, eotaxin-1, galectin-1, GITR y IL-17B R. Además, también se encontraron correlaciones negativas entre los niveles de eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, MIP-1 α y TROY, medidos en los estadios sintomático y/o terminal de la enfermedad, con la longevidad de los animales. Sin embargo, estos niveles resultaron ser muy variables y dependientes del estadio de la enfermedad, por lo que no se pudo determinar ningún marcador como pronóstico de supervivencia. Por tanto, con respecto a las citoquinas, los resultados apoyarían la hipótesis de que existe una predominancia de procesos inflamatorios que están acelerando el progreso de la enfermedad, pero no demuestran que dichas moléculas puedan desempeñar un papel como marcadores pronóstico en la ELA debido a su gran variabilidad (**Capítulo 1**).

No obstante, una de las citoquinas, la IL-6, resultó estar correlacionada con la longevidad desde el estadio sintomático, a diferencia del resto, por lo que se decidió estudiar su expresión a lo largo de la enfermedad en el modelo animal SOD1G93A en diferentes tejidos, y también su

papel como biomarcador en sangre de pacientes de ELA. Para ello, se estudió su expresión proteica en el modelo animal SOD1G93A en dos de los tejidos más afectados: médula espinal y músculo esquelético: extensor digital largo (EDL, fibras rápidas) y sóleo (SOL, fibras lentas), a lo largo de la enfermedad en cuatro estadios: presintomático (P40), sintomático temprano (P60), sintomático tardío (P90) y terminal (P120). Por último también nos interesó su papel como biomarcador diagnóstico mediante el análisis de su expresión génica y proteica en sangre de pacientes de ELA con respecto a pacientes de otras neuropatías e individuos sanos. En el modelo animal observamos que la expresión de IL-6 se encontraba disminuida en la médula espinal de los animales SOD1G93A con respecto a los WT en dos estadios: presintomático y terminal. En el músculo esquelético, el otro tejido afectado en la enfermedad, se observó que la IL-6 se expresaba de forma diferente según el tipo de fibra muscular: en el EDL (con predominio de fibras rápidas y tipo muscular más afectado en la enfermedad), su expresión fue aumentando en los ratones SOD1G93A conforme avanzaba el curso de la enfermedad; por el contrario, en el SOL, no se encontraron diferencias en la expresión entre los animales SOD1G93A y WT. Estos resultados sugieren que la expresión de la IL-6 que se encontró aumentada en EDL, músculo más afectado en la ELA, podría estar asociada al mayor daño observado en ese tejido. En cuanto a los pacientes de ELA, se observó una disminución de la expresión tanto génica como proteica de IL-6 en la sangre con respecto a los pacientes con otras neuropatías y sujetos sanos. Por otro lado, a pesar de que se observó una disminución de IL-6 asociada a la ELA, existe una gran variabilidad de esta citoquina en la sangre, por lo que quizás sería recomendable estudiar su papel como biomarcador en tejidos directamente afectados por la enfermedad, especialmente en músculo esquelético de pacientes con predominio de fibras de contracción rápida. (**Capítulo 2**).

Posteriormente, con el fin de conocer la posible utilización de factores inflamatorios como biomarcadores predictivos (utilizados en ensayos clínicos) se estudió la modificación de estas citoquinas sanguíneas y otras proteínas relacionadas con la inflamación tras la aplicación de un tratamiento basado en el fragmento C de la toxina tetánica (TTC), que ha demostrado su efectividad en el modelo animal en nuestro laboratorio. De los ratones tratados y sus controles se obtuvieron muestras seriadas de plasma a los 60, 90 y 110 días de edad, donde se analizaron los niveles proteicos de eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, MIP-1 α , y se extrajeron los tejidos más afectados de la enfermedad: médula espinal, EDL y SOL, para estudiar la expresión proteica de IL-6 y otras proteínas implicadas en el mecanismo del inflamasoma NLRP3. Aunque los niveles de las citoquinas en plasma no variaron con el tratamiento, la IL-6 sí que se observó disminuida en todos los tejidos analizados de los ratones tratados. En cuanto al inflamasoma NLRP3, TTC mostró también un efecto beneficioso pero en este caso dependió de los tejidos estudiados: en

médula espinal y SOL la proteína NLRP3 se encontró disminuida en los animales tratados con TTC; por otro lado, la expresión de caspasa-1 se encontró disminuida en EDL de los animales tratados, al contrario que en SOL donde se observó que estaba aumentada. Por tanto, aunque parece que TTC puede ejercer diferentes efectos dependiendo del tejido, se requieren más estudios que permitan aclarar su función en la regulación de este mecanismo. La disminución observada de IL-6 en todos los tejidos de los modelos animales tratados sugiere que TTC podría actuar como un modulador de los procesos inflamatorios dependientes de la activación de dicha citoquina (**Capítulo 3**).

La alteración que se ha demostrado en los diversos procesos inflamatorios en el modelo animal sugiere que la modulación de la inflamación en la ELA podría resultar un buen abordaje terapéutico. Por este motivo, se decidió evaluar el papel de marcadores inflamatorios como dianas terapéuticas en ELA. En concreto, se estudió el efecto de la reducción de los niveles génicos de granzima A (gzmA), implicada en procesos pro-inflamatorios, en la supervivencia del modelo animal SOD1G93A. Para ello se realizaron cruces de los animales SOD1G93A, modelo de ELA, con animales knock-out para dicha enzima, teniendo en cuenta el fondo genético de los mismos. Los resultados mostraron que los ratones SOD1G93A heterocigotos (gzmA +/-), donde encontramos una menor expresión de mRNA de gmzA, vivieron más que los ratones SOD1G93A homocigotos gzmA +/+, lo que confirmó que el aumento de la supervivencia estaba asociada a una menor expresión de este gen, aunque no a su completa ausencia, ya que los animales SOD1G93A homocigotos para la mutación (gzmA -/-) no incrementaron su supervivencia con respecto a los controles. Además, los niveles génicos de IL-1 β , citoquina pro-inflamatoria, y GSR, implicado en el estrés oxidativo, también se encontraron disminuidos en la médula espinal de los ratones heterocigotos gmzA +/-, sugiriendo una mejoría en los mismos. Estos resultados indican que niveles reducidos, pero no la ausencia total de gzmA, favorecen una progresión más lenta de la enfermedad en este modelo animal (**Capítulo 4**).

Por último, durante la realización de la presente tesis doctoral se llevó a cabo una revisión bibliográfica para profundizar en el tema de los biomarcadores inflamatorios en la ELA, cuestionando especialmente el papel de las citoquinas como buenos biomarcadores diagnóstico y pronóstico en la ELA, y proponiendo su potencial uso como dianas terapéuticas. Este manuscrito (**Anexo 1**) fue publicado en junio de 2019.

A continuación, se enumeran los manuscritos a los que se ha hecho mención anteriormente:

Capítulo 1. **Circulating Cytokines Could Not Be Good Prognostic Biomarkers in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.**

Moreno-Martínez, L.; de la Torre, M.; Toivonen, J.M.; Zaragoza, P.; García-Redondo, A.; Calvo, A.C.; Osta, R.

Frontiers in Immunology 2019;10:801. doi: 10.3389/fimmu.2019.00801

Capítulo 2. **Role of IL-6 in Amyotrophic Lateral Sclerosis**

Moreno-Martínez, L.; Calvo, A.C.; Moreno-García, L.; García-Salamero, G; Zaragoza, P.; García-Redondo, A.; Osta, R.

En preparación.

Capítulo 3. **Neuroprotective fragment C of tetanus toxin modulated inflammation in an ALS mouse model.**

Moreno-Martínez, L.; de la Torre, M; Muñoz, M.J.; Zaragoza, P.; Aguilera, J.; Calvo, A.C.; Osta R.

En preparación.

Capítulo 4. **Partial genetic deficiency of granzyme A prolongs survival in an ALS mouse model.**

Moreno-Martínez, L.; Santiago, L.; de la Torre M., Calvo, A.C.; Pardo, J.; Osta R.

Enviado a Journal of Neuroinflammation.

Anexo I. **Are circulating cytokines reliable biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis?**

Moreno-Martínez, L.; Calvo, A.C.; Muñoz, M.J. and Osta, R.

International Journal of Molecular Science. 2019, Volume 20, Issue 11, 2759. doi: 10.3390/ijms20112759



Circulating Cytokines Could Not Be Good Prognostic Biomarkers in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Moreno-Martínez, L.; de la Torre, M.; Toivonen, J.M.; Zaragoza, P.; García-Redondo, A.; Calvo, A.C.; Osta, R.

Frontiers in Immunology 2019;10:801. doi: 10.3389/fimmu.2019.00801



Circulating Cytokines Could Not Be Good Prognostic Biomarkers in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Laura Moreno-Martínez¹, Miriam de la Torre¹, Janne M. Toivonen¹, Pilar Zaragoza¹, Alberto García-Redondo², Ana Cristina Calvo^{1*} and Rosario Osta¹

¹ LAGENBIO, Faculty of Veterinary-IIIIS, IA2-CITA, CIBERNED, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, ² ALS Unit, Neurology Department, CIBERER U-723, Health Research Institute, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Manuela Mengozzi,
Brighton and Sussex Medical School,
United Kingdom

Reviewed by:

Sara Olivan,
Centre for Biomedical Network
Research (CIBER), Spain
Christian Lunetta,
Centro Clinico Nemo, Italy

*Correspondence:

Ana Cristina Calvo
accalvo@unizar.es

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 05 October 2018

Accepted: 26 March 2019

Published: 12 April 2019

Citation:

Moreno-Martínez L, de la Torre M,
Toivonen JM, Zaragoza P,
García-Redondo A, Calvo AC and
Osta R (2019) Circulating Cytokines
Could Not Be Good Prognostic
Biomarkers in a Mouse Model of
Amyotrophic Lateral Sclerosis.
Front. Immunol. 10:801.
doi: 10.3389/fimmu.2019.00801

Background: There is growing evidence of the role of inflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) during the last decade. Although the origin of ALS remains unknown, multiple potential inflammatory biomarkers have been described in ALS patients and murine models of this disease to explain the progressive motor neuron loss and muscle atrophy. However, the results remain controversial. To shed light on this issue, we aimed to identify novel biomarkers of inflammation that can influence disease progression and survival in serial blood samples from transgenic SOD1G93A mice, a model of ALS.

Methods: A cytokine array assay was performed to analyze protein expression of 97 cytokines in plasma samples from wildtype controls and transgenic SOD1G93A mice at asymptomatic stage. Subsequently, serial plasma samples were obtained from SOD1G93A mice at early symptomatic, symptomatic and terminal stages to monitor cytokine levels during disease progression through immunoassays. Comparisons of means of quantifiable cytokines between short- and long-lived mice were analyzed by unrelated *t*-test or Mann-Whitney U-test. Relationships between cytokines levels and survival time were assessed using Pearson's correlation analysis and Kaplan-Meier analysis.

Results: A total of 16 cytokines (6Ckine, ALK-1, CD30L, eotaxin-1, galectin-1, GITR, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17B R, MIP-1 α , MIP-3 β , RANKL, TROY, and VEGF-D) were found dysregulated in transgenic SOD1G93A mice at asymptomatic stage compared with age-matched controls. Immunoassays of serial samples revealed positive expression of ALK-1, GITR and IL-17B R at P60 and P90 in mice with shorter survival. In addition, eotaxin-1 and galectin-1 levels were significantly increased at terminal stage in SOD1G93A mice that showed shorter survival time. Finally, levels of eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, MIP-1 α , and TROY at P90 or endpoint negatively correlated with the longevity of transgenic mice.

Conclusions: We demonstrated in the SOD1G93A model of ALS that increased levels of several cytokines were associated with a shorter lifespan. However, their role as prognostic biomarkers is unclear as their expression was very variable depending on both the disease stage and the subject. Nevertheless, cytokines may be potential therapeutic targets.

Keywords: cytokines, biomarkers, SOD1 G93A mice, plasma, amyotrophic lateral sclerosis

INTRODUCTION

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is one of the most common rare diseases of unknown origin that leads to progressive motor neuron degeneration and muscle denervation (1). In particular, it has been described that either distal axonopathy or neuromuscular junction damage precedes motor neuron loss (2). The known mutations that produce the typical adult ALS phenotype are, in order of frequency, the hexanucleotide repeat expansion in C9orf72, mutations related to the copper/zinc superoxide-dismutase-1 gene (SOD1), Tar DNA-binding protein gene (TARDBP) and DNA/RNA-binding protein FUS (fused in sarcoma) (3, 4). Only 5–10% of ALS cases are familial, whereas the rest of ALS cases are sporadic, most of them with unknown cause.

The immune system has emerged as one of the key players linked to the development of neurodegeneration, such as in ALS (5–10). The immune system seems to have a dual role, polarizing its functional phenotype toward an inflammatory M1 phenotype or toward an anti-inflammatory M2 phenotype, depending on the particular neurodegenerative environment and by disease stage (7, 11). Although the exact and sequential processes by which the immune system can influence the course of the disease in ALS remains unclear, many studies have suggested immune-related biomarkers can help to predict the progression of the disease (5, 11–13). For example, reactive microglia and astrocytes adjacent to degenerating motor neurons secrete signal molecules

Abbreviations: 6Ckine, Chemokine (C-C motif) ligand 21; AD, Alzheimer's disease; ALK-1, Activin receptor-like kinase 1; ALS, Amyotrophic lateral sclerosis; C9orf72, Chromosome 9 Open Reading Frame 72; CCL21, Chemokine (C-C motif) ligand 21; CD30L, Cluster of Differentiation 30 ligand; CSF, Cerebrospinal fluid; DNA, Deoxyribonucleic acid; EDTA, Ethylenediaminetetra-acetic acid; FUS, Fused in sarcoma; GTR, Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor; IL-2, Interleukin 2; IL-6, Interleukin 6; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IL-17A R, Interleukin 17A receptor; IL-17B R, Interleukin 17B receptor; LINGO-1, Leucine rich repeat and Immunoglobulin-like domain-containing protein 1; MIP-1 α , Macrophage inflammatory protein 1 alpha; MIP-3 β , Macrophage inflammatory protein 3 beta; NgR1, Neuregulin 1; NK, Natural killer; P40, Postnatal day 40; P60, Postnatal day 60; P90, Postnatal day 90; PCR, Polymerase chain reaction; RANKL, Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; RNA, Ribonucleic acid; RTN4R, Reticulon 4 Receptor; SEM, Standard error of the mean; SOD1G93A, Superoxide dismutase 1, with glycine to alanine transition at position 93; SPSS, Statistical Package for the Social Sciences; TARDBP, Tar DNA-binding protein gene; Th2, T Helper Cell Type 2; TLS, Translocation in liposarcoma; TNF, Tumor necrosis factor; TNFR, Tumor necrosis factor receptor; TNFRSF18, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18; TNFRSF19, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19; TNFSE, Tumor necrosis factor ligand superfamily; TNFSF8, Tumor necrosis factor ligand superfamily member 8; Treg, T regulatory cells; TROY, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19; VEGF-D, Vascular endothelial growth factor D; WT, Wildtype.

to blood, and these may play a key role in the propagation of the disease (12, 14, 15). In this sense, the possibility of studying blood as a matrix to identify immunologic signals can lead to a better understanding of the disease and to the discovery of novel predictive biomarkers of disease progression.

Expression of several cytokines has been recently described altered in blood of ALS patients. Some studies have pointed out that interleukin (IL)-2 and IL-6 levels together with other interleukins remained increased toward terminal stages in blood samples from ALS patients (13, 16). However, these results are not consistent with some other studies. For instance, IL-6 levels were found to decrease along disease progression in definite ALS patients in a 6-month period, whereas in the same patients IL-2 showed the opposite trend (11). This suggests dynamic alterations in cytokine levels may occur depending on disease stage or the patients themselves. Accordingly, a recent meta-analysis indicated that alterations in some cytokines were inconsistent between published studies (17). These contradictory results may reflect the unavoidable heterogeneity found in ALS patients, which could possibly be mitigated using an animal model maintained under controlled environmental conditions. In this sense, the SOD1G93A mouse model of ALS, has already demonstrated its potential in the discovery of molecular markers that are conserved between human patients (18–20). Regarding immunity, a recent meta-analysis indicated that IL-6 and some other cytokine levels are increased in transgenic SOD1G93A mice (18); however, analysis of cytokines serially monitored along disease progression has not been reported in SOD1G93A mice to date.

Under this complex scenario, we have focused our work in studying levels of inflammatory markers in serial plasma samples from transgenic SOD1G93A mice to identify those that could influence disease progression and survival of mutant animals. The identification of potential prognostic biomarkers involved in inflammation in this model could enhance the successful translation of the results to ALS patients. In addition, this study may contribute to shed light on whether or not cytokines could be reliable prognostic biomarkers for ALS or maybe they could be better considered as potential therapeutic targets.

MATERIALS AND METHODS

Animals

B6SJL-Tg SOD1G93A mice (stock number 002726) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Experimental hemizygous transgenic mice were obtained by mating hemizygous SOD1G93A males with C57BL/6J x SJL/J F1

hybrid females (B6SJLF1) purchased from Janvier Labs (Saint-Berthevin Cedex, France). The offspring were identified by PCR assay as described in The Jackson Laboratory protocol. The mice were housed at the animal facilities in Centro de Investigación Biomédica de Aragón under a standard light:dark (12:12) cycle. Food and water were provided *ad libitum*. The humane endpoint for these mice is defined as the loss of righting reflex as shown by a failure to right after laying the mouse on its side for 30 s (21).

All procedures were approved by the Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza. The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Sample Collection

Blood was taken from 6 hemizygous SOD1G93A males and females and their wildtype (WT) littermates at 40 days of age (P40), which corresponds to the asymptomatic stage of the disease. On the other hand, serial plasma samples were taken from 84 SOD1G93A mice at early symptomatic (60 days of age) (P60), symptomatic (90 days of age) (P90), and terminal or endpoint stages (from 112 to 150 days of age). Plasma samples at P60 and P90 were obtained from submandibular bleeding, whilst those at terminal stage were collected from blood extracted by cardiac puncture. For this, the mice were euthanized with CO₂, then blood was extracted and transferred to EDTA coated mini vacutainer tubes (BD Biosciences, USA). Then, blood was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at 4°C within 30 min from extraction, plasma was collected and immediately frozen in dry ice and stored at -80°C.

Cytokine Array Assay

A cytokine array assay was performed to analyze protein levels of 97 cytokines (Mouse Cytokine Antibody Array G6, Raybiotech, Inc.) in plasma samples from 6 WT and 6 SOD1G93A mice at P40. The array was carried out by the service offered by Raybiotech, Inc.

Multiplex and Quantibody Immunoassays

From the 84 serial plasma samples obtained, 32 SOD1G93A mice showing the longest (from 133 to 150 days old) and the shortest (from 112 to 126 days old) survival time were selected to study cytokine levels during disease progression through a multiplex and quantibody immunoassays. The multiplex immunoassay (ProcartaPlex Multiplex Immunoassay, Affymetrix eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc.) was carried out for the protein analysis of eotaxin-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha (α), and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) in plasma from 20 SOD1G93A mice. Additionally, a total of 9 cytokines were analyzed using a quantibody array (Quantibody[®] Mouse Cytokine Array, Raybiotech, Inc.) in samples from 12 SOD1G93A mice. The cytokines studied were: chemokine (C-C motif) ligand 21 (CCL21 or 6Ckine), activin receptor-like kinase (ALK)-1, tumor necrosis factor (TNF) ligand superfamily member 8 (TNFSF8 or CD30L), Galectin-1, TNF receptor

superfamily member 18 (TNFRSF18 or GITR), interleukin 17B receptor (IL-17B R), MIP-3 beta (β), TNF receptor superfamily member 19 (TNFRSF19 or TROY), and vascular endothelial growth factor (VEGF)-D.

Statistical Analysis

Comparisons of results obtained in cytokine array assay between the WT and SOD1G93A groups were made using *t*-tests or Mann-Whitney U-tests, according to data distribution analyzed by Shapiro-Wilk test. For cytokines whose expression was not quantifiable at some point of the disease progression, relationships between positive or null cytokine expression and survival time were evaluated through a Kaplan-Meier analysis. On the other hand, comparisons of means of quantifiable cytokines between short- and long-lived mice were analyzed by unrelated *t*-test or Mann-Whitney U-test. Finally, correlations between cytokines levels and survival time were assessed using Pearson's correlation analysis.

Statistical analysis was performed using SPSS (version 20, IBM, Armonk, NY) and GraphPad Prism Software (version 5, La Jolla, CA). All of the values were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Significance levels were set at a *p* < 0.05.

RESULTS

Sixteen Cytokines Were Dysregulated at the Asymptomatic Stage in Transgenic SOD1G93A Mice

Plasma was analyzed from 6 hemizygous SOD1G93A males and females and their wildtype littermates at P40, the asymptomatic stage, through a cytokine array assay. The analysis identified 15 cytokines significantly upregulated (6Ckine, ALK-1, CD30L, galectin-1, eotaxin-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17B R, MIP-1 α , MIP-3 β , RANKL, TROY, and VEGF-D) and one significantly downregulated (GITR) in SOD1G93A mice (Figure 1). Therefore, our next step was to investigate the inflammatory response to the disease progression through the analysis of these 16 cytokines in serial plasma samples.

Expression Profile of ALK-1, Eotaxin-1, Galectin-1, GITR, and IL-17B R Along Disease Progression Was Associated With Shorter Survival Rate of Transgenic SOD1G93A Mice

Firstly, multiplex and quantibody immunoassays were performed in serial plasma samples from the mutant animals to investigate how levels of the cytokines altered in the asymptomatic stage evolved along disease progression. Three plasma samples were obtained from each animal, corresponding to early symptomatic (P60), symptomatic (P90) and terminal stage (endpoint). Then, the 32 animals showing the shortest and the longest survival time were selected to assess the effect of cytokine expression on longevity at each stage of the disease.

Expression of 7 cytokines (6Ckine, ALK-1, CD30L, GITR, IL-17B R, MIP-3 β , and VEGF-D) was not quantifiable in all stages.

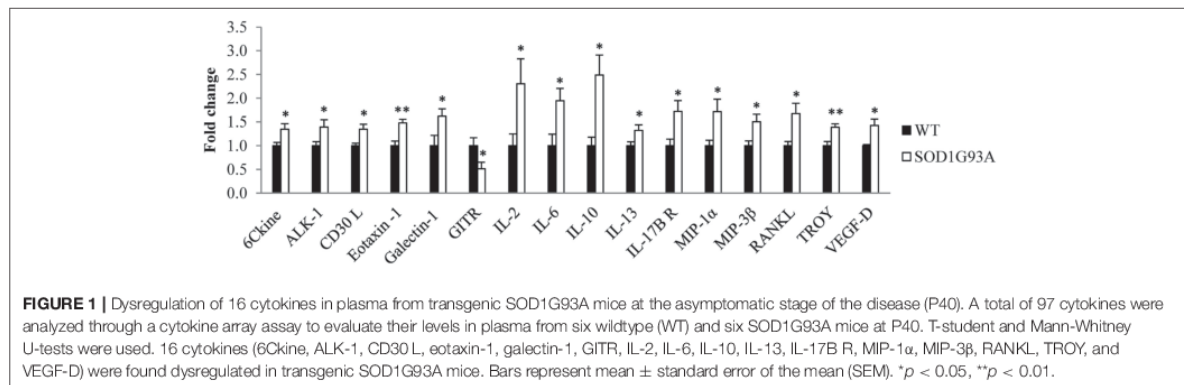


FIGURE 1 | Dysregulation of 16 cytokines in plasma from transgenic SOD1G93A mice at the asymptomatic stage of the disease (P40). A total of 97 cytokines were analyzed through a cytokine array assay to evaluate their levels in plasma from six wildtype (WT) and six SOD1G93A mice at P40. T-student and Mann-Whitney U-tests were used. 16 cytokines (6Ckine, ALK-1, CD30 L, eotaxin-1, galectin-1, GITR, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17B R, MIP-1α, MIP-3β, RANKL, TROY, and VEGF-D) were found dysregulated in transgenic SOD1G93A mice. Bars represent mean ± standard error of the mean (SEM). **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

TABLE 1 | Relationships between positive or null expression of cytokines with survival time in transgenic SOD1G93A mice at each stage of the disease.

Cytokines	P60	P90	Endpoint
6Ckine	No sig	No sig	No sig
ALK-1	* <i>p</i> = 0.016	** <i>p</i> = 0.003	No sig
CD30L	No sig	No sig	No sig
GITR	** <i>p</i> = 0.009	* <i>p</i> = 0.019	No sig
IL-17B R	* <i>p</i> = 0.016	No sig	No sig
MIP-3β	No sig	No sig	No sig
VEGF-D	No sig	No sig	No sig

Twelve animals were grouped depending on the presence or absence of cytokines measured in their plasma. The relationships between their expression and their survival time were evaluated through a Kaplan-Meier analysis and Log-Rank test. Positive expression of ALK-1, GITR, and IL-17B R at P60, and ALK-1 and GITR at P90 was found in mice with shorter survival. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

Consequently, two animal groups were formed depending on the positive or null expression of these cytokines in plasma. Then, Kaplan-Meier analysis was used to evaluate relationships between longevity and presence/absence of cytokine expression. This analysis revealed that positive expression of ALK-1, GITR at P60 and P90, and IL-17B R at P60 was associated with shorter survival rate (Table 1). In contrast, no associations were found between expression and longevity in the terminal stage. This means that the animals having a longer survival rate had undetectable levels of these cytokines in symptomatic stages of the disease.

On the other hand, levels of the remaining cytokines (eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, MIP-1α, RANKL, and TROY) were continuously monitored in the three stages studied. We observed higher expression of the cytokines in animals showing short survival rate, although only eotaxin-1 and galectin-1 were significantly upregulated at endpoint in animals exhibiting shorter survival compared to the levels observed in long-lived animals (Figure 2).

Eotaxin-1, Galectin-1, IL-2, IL-6, MIP-1α, and TROY Levels at P90 or Endpoint Negatively Correlated With Survival Time

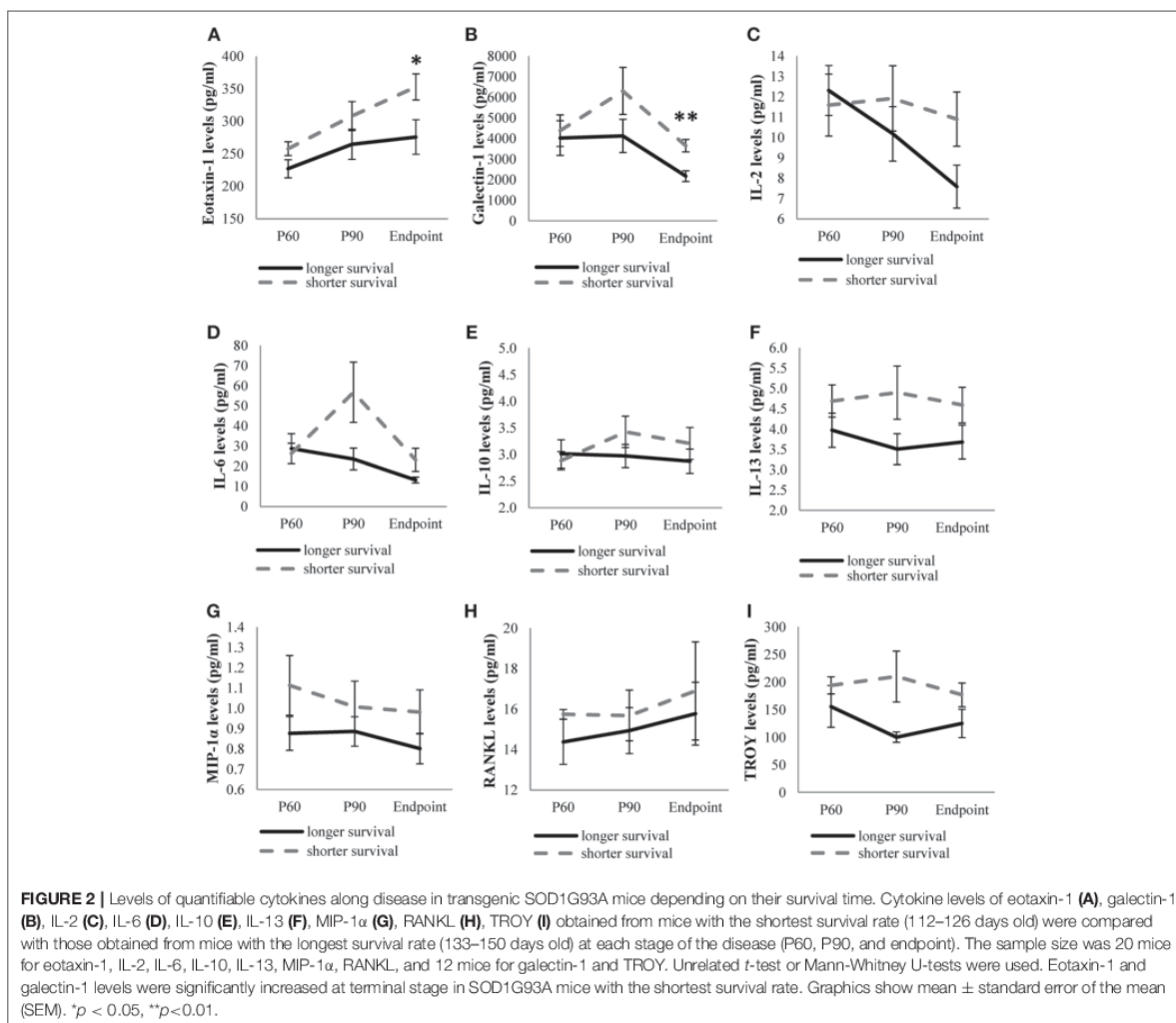
To analyze more in depth whether the levels of quantifiable cytokines (eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, MIP-1α, and TROY)

could influence longevity of mice, the expression levels of cytokines were correlated with the survival rate in SOD1G93A mice. Pearson correlation analysis showed negative correlations between survival rate of the animals and the levels of eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, MIP-1α and TROY at P90 or endpoint (Table 2), revealing that the higher the expression of these cytokines the lower the survival rate in SOD1G93A mice.

DISCUSSION

The active role of pro-inflammatory cytokines, enhancing the development of ALS, has been reported in both animal models and ALS patients (7, 13, 17, 22). The possibility of studying the interplay between inflammation and disease progression in easily accessible tissues, such as plasma, is an essential step to identify potential biomarkers that could help for an early prognosis of the disease. An easily testable panel of potential predictors of disease progression could help to validate the findings from the animal models to ALS patients and, thus, facilitate the translation of these at clinical level. In this sense, we have studied a panel of 97 cytokines, some of them newly related to ALS in this study, in serial plasma samples from transgenic SOD1G93A mice. The possibility of analyzing these cytokines in the asymptomatic stage in this animal model can provide information about early factors involved in disease progression and in survival, normally not possible to obtain in ALS patients, validating in this way their prognostic capacity.

Firstly, we performed a cytokine array assay to measure expression levels of 97 cytokines in plasma from WT and transgenic SOD1G93A mice at the asymptomatic stage of the disease. Among all cytokines, 16 of them were found significantly dysregulated in transgenic SOD1G93A mice. These results support the fact that immune system was already altered in the asymptomatic stage of the disease through a dysregulation of both pro- and anti-inflammatory cytokines, as previously reported (17, 18, 23). Moreover, these findings reveal for the first time the role of some cytokines that had not been related to ALS yet, including chemokines belonging to the tumor necrosis factor (TNF) and tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamilies (CD30 L, GITR, TRANCE, TROY), chemokine ligands family



(6Ckine, MIP-3 β) and other cytokines (ALK-1, VEGF-D). These premature alterations may have a prejudicial role in exacerbating pathologic mechanisms in ALS.

Considering that a compensatory response to inflammation can promote longer survival, as previously reported in this animal model (24, 25), our next step was to analyze more in depth the potential modulatory effect of these cytokines on the longevity of the animals. In this study, the differences in the survival rate of SOD1G93A mice let us monitor the expression of the studied cytokines along disease progression in two groups of animals, short- and long-lived animals. In addition, the expression levels of some of the selected cytokines could not be continuously monitored along the disease progression in the SOD1G93A mice. Therefore, we classified cytokines in two groups, those that were quantifiable along the disease progression, and those that could not be continuously quantified. Regarding this last group

(6Ckine, ALK-1, CD30 L, GITR, IL-17B R, MIP-3 β , and VEGF-D), the association between the positive or null expression of these cytokines and the survival rate of SOD1G93A mice was analyzed. We observed that the positive expression of ALK-1, GITR and IL-17B R at symptomatic stages (P60 and P90) was associated with shorter survival rate. ALK-1 is a type I cell surface receptor for the transforming growth factor- β (TGF- β) family of proteins involved in endothelial cells biology and angiogenesis (26). GITR (TNFSF member 18) plays an important role in expansion of peripheral regulatory T cells (Tregs) (27, 28), which have been associated with slow progression of ALS (29, 30). However, GITR can be also expressed on effector T cells, favoring inflammatory process that could accelerate the neurodegenerative progression in a Ying-Yang unbalance, which is more in accordance with our findings that showed an association of GITR expression at the symptomatic stages in

TABLE 2 | Correlations between cytokine expression and survival time at each stage.

Cytokines	Stage	p-value	Pearson
Eotaxin-1	Endpoint	*0.046	-0.450
Galectin-1	Endpoint	**0.009	-0.744
IL-2	Endpoint	*0.032	-0.481
IL-6	P90	*0.045	-0.465
	Endpoint	*0.024	-0.544
MIP-1 α	Endpoint	*0.048	-0.448
TROY	P90	*0.042	-0.620

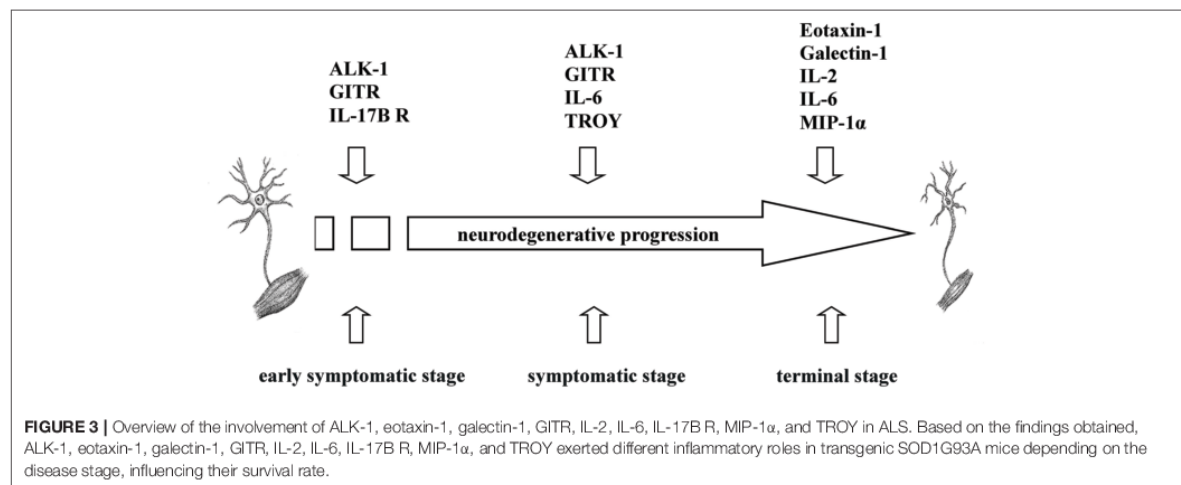
Relationships between quantifiable cytokines levels and survival time at P60, P90, and endpoint were assessed using Pearson's correlation analysis. The sample size was 20 mice for eotaxin-1, IL-2, IL-6, MIP-1 α , and 12 mice for galectin-1 and TROY. Negative correlations were found between survival time and levels of IL-6 and TROY at P90, and eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, and MIP-1 α at endpoint. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

transgenic animals with shorter survival rates (31). Regarding IL-17B R, it is part of the complex of chains for the IL-17E receptor together with IL-17A R. Although no involvement of IL-17B R in ALS has been reported so far, levels of IL-17A were found elevated in serum of ALS patients compared to control subjects (32). In addition, IL-17E promotes Th2 immune response (33), releasing anti-inflammatory cytokines, which could counteract the inflammation and therefore, slowing down disease progression.

In relation to the cytokines whose expression was quantifiable in all stages (eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, MIP-1 α , RANKL, and TROY), our findings showed that eotaxin-1 and galectin-1 levels were significantly upregulated at the endpoint stage in the transgenic mice that exhibited shorter survival rate. These results suggest that increased levels of these cytokines may aggravate the disease course, especially at terminal stages. Eotaxin-1 is a potent eosinophil chemoattractant whose role in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), Huntington's disease, multiple sclerosis and ALS has been previously studied (34, 35). In accordance with our results, increased levels of eotaxin-1 in serum and in cerebrospinal fluid (CSF) from ALS patients vs. controls were observed in previous studies (36, 37). In contrast, increased eotaxin-1 levels in CSF from ALS patients correlated with slow disease progression, suggesting that it might play a protective role in ALS (38). These differences could be due to the different nature of the studied tissue in which eotaxin-1 was measured. In fact, CSF and plasma cytokines do not always show similar values, as previously reported (39–41). Galectin-1 is a member of the β -galactoside-binding lectin family which has been associated with activated astrocytes and neurofilamentous lesions in the spinal cord of SOD1G93A mice and ALS patients before the onset of symptoms (42, 43). In contrast, it has been reported that galectin-1 can protect against neurodegeneration through glycosylation-dependent inactivation of M1 cells (microglia inducing neurotoxic T-cell response) (44) and that oxidized galectin-1 shows neuroprotective effect by promoting axonal regeneration (45, 46). Therefore, galectin-1 seems to have a dual role depending on its oxidized form or the disease

stage. A possible explanation for this might be that galectin-1 could not be able to exert its protective effect due to underlying mechanisms, for instance, when there is a wrong addressing to the target tissues or an inactivation of its action through other effectors. Therefore, it would be interesting to study galectin-1 expression simultaneously in plasma and target tissues to elucidate its role in ALS more accurately.

Considering the fact that decreased levels of some of these cytokines were associated with a longer lifespan in transgenic mice, we analyzed the relationship of the quantifiable cytokines along disease progression in transgenic SOD1G93A mice with their survival rate. Pearson analysis showed that IL-6 and TROY at the symptomatic stage, and eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, and MIP-1 α at terminal stage were negatively correlated with survival time of mice. These findings reflected that the inflammatory response in the animals from the symptomatic stage could favor faster disease progression. Regarding eotaxin-1 and galectin-1, their levels were increased in animals which lived shorter. However, opposing results have been found in the literature, as aforementioned, suggesting that more research needs to be undertaken to clarify their participation in ALS progression. On the other hand, increased levels of IL-2 in plasma correlated with poor survival rate, which is consistent with other studies (16, 47). On the contrary, no correlation was found with disease duration in neither CSF nor serum of ALS patients in other works (48). IL-2 could exert a dual role in ALS by induction of Tregs and by activation of natural killer (NK) cells, which are cytotoxic for some neurons (16, 49). One possible explanation could be based on the activation of NK cells by higher IL-2 levels at terminal stage, contributing to faster disease progression. IL-6 has been related to ALS in several studies (11, 13, 16, 50–52), although alterations of this cytokine do not seem to be specific to ALS. Particularly, it has been linked to other neurodegenerative diseases, such as AD and Parkinson's disease (53, 54). In our study we observed that higher IL-6 levels at P90 and endpoint correlated with shorter lifespan. Increasing IL-6 levels have been described along disease progression in plasma from ALS patients, although no correlation with the lifespan was found (16, 48). On the contrary, reducing IL-6 levels along time have also been reported in ALS patients (11). These opposing results could suggest that the disease stage when IL-6 levels were measured could be relevant to promote a favorable or detrimental effect in the transgenic animal. In addition, the dual role of IL-6 as a pro- and anti-inflammatory interleukin can also depend on where this cytokine is secreted, showing an anti-inflammatory effect in the skeletal muscle (18, 55). MIP-1 α is a neutrophil chemoattractant and activator (56), and it is expressed by astrocytes in CNS in response to inflammation (57). We found an association of increased levels of MIP-1 α at endpoint with shorter survival rate. Accordingly, increased MIP-1 α levels have been reported in both CSF and serum samples from ALS patients and they correlated negatively with the disease progression (58). In contrast, other studies suggested a positive correlation with the disease progression (48, 58), while some others did not find any variation in this chemokine in ALS patients respect



to healthy controls (37), revealing again the controversy of results found in the literature regarding these chemokines. TROY levels negatively correlated with lifespan at the symptomatic stage of the disease. Very little is found in the literature on TROY's involvement in ALS. TROY is a TNF receptor family member expressed in the adult nervous system and forms a functional receptor complex with RTN4R (NgR1) and LINGO-1 involved in mediating myelin inhibition (59, 60). In addition, TROY is a negative regulator of oligodendrocyte development (61). Alterations in genes involved in myelin structure and function, and affected oligodendrocytes in the spinal cord have been described in a mouse model, contributing to the disruption of axonal integrity and motor neuronal death (62, 63). Since TROY is involved in both regulation of myelination and oligodendrocyte development, our findings could suggest that TROY could be exacerbating disease course, exerting its major effect at the symptomatic stage.

To sum up, we found that increased levels of five cytokines (ALK-1, eotaxin-1, galectin-1, GTR, IL-17B R) were associated with transgenic mice that exhibited a shorter survival rate at specific time points during disease progression, which may indicate that the pro-inflammatory nature of these cytokines could influence the survival time in transgenic mice. Similarly, negative correlations between the survival rate and the expression of six cytokines (eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6, MIP-1 α , and TROY) at P90 or terminal stages were found. Therefore, pro-inflammatory cytokines secreted in plasma could modulate peripheral inflammatory response depending on the stage of the disease at which they are released; consequently, high levels of these cytokines could aggravate the course of the disease favoring shorter longevity in the animals (Figure 3).

Taken together, our results showed a panel of cytokines, some of them first described in ALS, in serial plasma samples that influenced survival in transgenic SOD1G93A mice, highlighting an activation of immune system dependent on the disease

stage. However, to date there is not a consensus for the function of any cytokine in ALS, as their expression in blood seems to be very variable. The potential advantages of finding a biomarker in blood are minimal invasiveness and easy accessibility; however, maybe it is not the best option for measuring and studying cytokines as prognostic biomarkers, as those molecules are susceptible to change by other alterations occurring in the subject. Nevertheless, the findings obtained in this study confirmed that a predominant pro-inflammatory status could exacerbate the disease course; therefore, cytokines could be considered molecular targets for potential therapies.

ETHICS STATEMENT

All procedures were approved by the Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza. The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC, AG-R, PZ, and RO were implied in the experimental design. LM-M and MdIT collected plasma samples from mice at different stages and performed immunoassays to analyze cytokine levels. AC and LM-M interpreted the data and performed the statistical analysis. AC, JT, LM-M, and RO were major contributors in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was funded by Instituto de Salud Carlos III (Grant PI17/00949) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) Una manera de hacer Europa from the European Union, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre

Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Consolidated Groups from Gobierno de Aragón, Fundación Sesé and Plataforma afectados por la ELA. LM-M is supported by Departamento de Industria e Innovación from Gobierno de Aragón and Fondo Social Europeo.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge SCT Separación Celular y Citometría from Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) for their help about the methodology of immunoassays.

REFERENCES

- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. World Federation of Neurology Research Group on motor neuron diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* (2000) 1:293–9. doi: 10.1080/146608200300079536
- Dupuis L, Loeffler JP. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr Opin Pharmacol.* (2009) 9:341–6. doi: 10.1016/j.coph.2009.03.007
- Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol.* (2011) 7:603–15. doi: 10.1038/nrneuro.2011.150
- Jones AR, Woollacott I, Shatunov A, Cooper-Knock J, Buchman V, Sproviero W, et al. Residual association at C9orf72 suggests an alternative amyotrophic lateral sclerosis-causing hexanucleotide repeat. *Neurobiol Aging.* (2013) 34:2234.e1–e7. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.003
- Phani S, Re DB, Przedborski S. The role of the innate immune system in ALS. *Front Pharmacol.* (2012) 3:150. doi: 10.3389/fphar.2012.00150
- Zhao W, Beers DR, Appel SH. Immune-mediated mechanisms in the pathoprotection of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* (2013) 8:888–99. doi: 10.1007/s11481-013-9489-x
- Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and toxic neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics.* (2015) 12:364–75. doi: 10.1007/s13311-014-0329-3
- Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science.* (2016) 353:777–83. doi: 10.1126/science.aag2590
- Gustafson MP, Staff NP, Bornschelegl S, Butler GW, Maas ML, Kazamel M, et al. Comprehensive immune profiling reveals substantial immune system alterations in a subset of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0182002. doi: 10.1371/journal.pone.0182002
- Liu J, Wang F. Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: cellular mechanisms and therapeutic implications. *Front Immunol.* (2017) 8:1005. doi: 10.3389/fimmu.2017.01005
- Ehrhart J, Smith AJ, Kuzmin-Nichols N, Zesiewicz TA, Jahan I, Shytle RD, et al. Humoral factors in ALS patients during disease progression. *J Neuroinflamm.* (2015) 12:127. doi: 10.1186/s12974-015-0350-4
- Poloni M, Facchetti D, Mai R, Micheli A, Agnoletti L, Francolini G, et al. Circulating levels of tumour necrosis factor- α and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* (2000) 287:211–14. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01177-0
- Blasco H, Garçon G, Patin F, Veyrat-Durebex C, Boyer J, Devos D, et al. Panel of oxidative stress and inflammatory biomarkers in ALS: a pilot study. *Can J Neurol Sci.* (2017) 44:90–5. doi: 10.1017/cjn.2016.284
- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, et al. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [^{11}C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis.* (2004) 15:601–9. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.012
- Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol.* (2011) 10:253–63. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70015-1
- Lu CH, Allen K, Oei F, Leoni E, Kuhle J, Tree T, et al. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* (2016) 3:e244. doi: 10.1212/NXI.0000000000000244
- Hu Y, Cao C, Qin XY, Yu Y, Yuan J, Zhao Y, et al. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. *Sci Rep.* (2017) 7:9094. doi: 10.1038/s41598-017-09097-1
- Jeyachandran A, Mertens B, McKissick EA, Mitchell CS. Type I Vs. Type II cytokine levels as a function of SOD1 G93A mouse amyotrophic lateral sclerosis disease progression. *Front Cell Neurosci.* (2015) 9:462. doi: 10.3389/fncel.2015.00462
- Toivonen JM, Manzano R, Olivan S, Zaragoza P, Garcia-Redondo A, Osta R. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE.* (2014) 9:e89065. doi: 10.1371/journal.pone.0089065
- Calvo AC, Manzano R, Atencia-Cibreiro G, Olivan S, Munoz MJ, Zaragoza P, et al. Genetic biomarkers for ALS disease in transgenic SOD1(G93A) mice. *PLoS ONE.* (2012) 7:e32632. doi: 10.1371/journal.pone.0032632
- Acevedo-Arozena A, Kalmar B, Essa S, Ricketts T, Joyce P, Kent R, et al. A comprehensive assessment of the SOD1G93A low-copy transgenic mouse, which models human amyotrophic lateral sclerosis. *Dis Model Mech.* (2011) 4:686–700. doi: 10.1242/dmm.007237
- Evans MC, Couch Y, Sibson N, Turner MR. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci.* (2013) 53:34–41. doi: 10.1016/j.mcn.2012.10.008
- Henkel JS, Beers DR, Siklos L, Appel SH. The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Mol Cell Neurosci.* (2006) 31:427–37. doi: 10.1016/j.mcn.2005.10.016
- Nardo G, Trolese MC, de Vito G, Cecchi R, Riva N, Dina G, et al. Immune response in peripheral axons delays disease progression in SOD1G93A mice. *J Neuroinflamm.* (2016) 13:261. doi: 10.1186/s12974-016-0732-2
- Staats KA, Humblet-Baron S, Bento-Abreu A, Scheveneels W, Nikolaou A, Deckers K, et al. Genetic ablation of IP3 receptor 2 increases cytokines and decreases survival of SOD1G93A mice. *Hum Mol Genet.* (2016) 25:3491–9. doi: 10.1093/hmg/ddw190
- Gonzalez-Nunez M, Munoz-Felix JM, Lopez-Novoa JM. The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy? *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1832:1492–510. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.05.016
- Petrillo MG, Ronchetti S, Ricci E, Alunno A, Gerli R, Nocentini G, et al. GTR+ regulatory T cells in the treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* (2015) 14:117–26. doi: 10.1016/j.autrev.2014.10.011
- Ronchetti S, Ricci E, Petrillo MG, Cari L, Migliorati G, Nocentini G, et al. Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related protein: a key marker of functional regulatory T cells. *J Immunol Res.* (2015) 2015:171520. doi: 10.1155/2015/171520
- Henkel JS, Beers DR, Wen S, Rivera AL, Toennis KM, Appel JE, et al. Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med.* (2013) 5:64–79. doi: 10.1002/emmm.201201544
- Beers DR, Zhao W, Wang J, Zhang X, Wen S, Neal D, et al. ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight.* (2017) 2:e89530. doi: 10.1172/jci.insight.89530
- Qiao YC, Pan YH, Ling W, Tian F, Chen YL, Zhang XX, et al. The Yin and Yang of regulatory T cell and therapy progress in autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* (2017) 16:1058–70. doi: 10.1016/j.autrev.2017.08.001
- Fiala M, Chattopadhyay M, La Cava A, Tse E, Liu G, Lourenco E, et al. IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. *J Neuroinflamm.* (2010) 7:76. doi: 10.1186/1742-2094-7-76
- Popova A, Kzhyshkowska J, Nurgazieva D, Goerdts S, Gratchev A. Smurf2 regulates IL17RB by proteasomal degradation of its novel binding partner DAZAP2. *Immunobiology.* (2012) 217:321–8. doi: 10.1016/j.imbio.2011.10.004

34. Adzemovic MZ, Ockinger J, Zeitelhofer M, Hochmeister S, Beyeen AD, Paulson A, et al. Expression of Cdl1 associates with immune response modulation and protection against neuroinflammation in rats. *PLoS ONE*. (2012) 7:e39794. doi: 10.1371/journal.pone.0039794
35. Huber AK, Giles DA, Segal BM, Irani DN. An emerging role for eotaxins in neurodegenerative disease. *Clin Immunol*. (2016) 189:29–33. doi: 10.1016/j.clim.2016.09.010
36. Kuhle J, Lindberg RL, Regeniter A, Mehling M, Steck AJ, Kappos L, et al. Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol*. (2009) 16:771–4. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02560.x
37. Tateishi T, Yamasaki R, Tanaka M, Matsushita T, Kikuchi H, Isobe N, et al. CSF chemokine alterations related to the clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol*. (2010) 222:76–81. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.03.004
38. Furukawa T, Matsui N, Fujita K, Nodera H, Shimizu F, Miyamoto K, et al. CSF cytokine profile distinguishes multifocal motor neuropathy from progressive muscular atrophy. *Neuro Neuroimmunol Neuroinflamm*. (2015) 2:e138. doi: 10.1212/NXI.0000000000000138
39. Wilson ME, Boumaza I, Lacomis D, Bowser R. Cystatin C: a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*. (2010) 5:e15133. doi: 10.1371/journal.pone.0015133
40. Freischmidt A, Muller K, Ludolph AC, Weishaupt JH. Systemic dysregulation of TDP-43 binding microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun*. (2013) 1:42. doi: 10.1186/2051-5960-1-42
41. Su XW, Simmons Z, Mitchell RM, Kong L, Stephens HE, Connor JR. Biomarker-based predictive models for prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol*. (2013) 70:1505–11. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.4646
42. Kato T, Kurita K, Seino T, Kadoya T, Horie H, Wada M, et al. Galectin-1 is a component of neurofilamentous lesions in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. (2001) 282:166–72. doi: 10.1006/bbrc.2001.4556
43. Kobayakawa Y, Sakumi K, Kajitani K, Kadoya T, Horie H, Kira J, et al. Galectin-1 deficiency improves axonal swelling of motor neurones in SOD1(G93A) transgenic mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*. (2015) 41:227–44. doi: 10.1111/na.12123
44. Starosom SC, Mascanfroni ID, Imitola J, Cao L, Raddassi K, Hernandez SF, et al. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity*. (2012) 37:249–63. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.023
45. Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, Kimura H, Arawaka S, Kawanami T, et al. Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. (2005) 194:203–11. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.02.011
46. Kato T, Ren CH, Wada M, Kawanami T. Galectin-1 as a potential therapeutic agent for amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets*. (2005) 6:407–18. doi: 10.2174/1389450054021846
47. Michaelson N, Facciponte D, Bradley W, Stommel E. Cytokine expression levels in ALS: a potential link between inflammation and BMAA-triggered protein misfolding. *Cytokine Growth Factor Rev*. (2017) 37:81–8. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.05.001
48. Guo J, Yang X, Gao L, Zang D. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS. *Brain Behav*. (2017) 7:e00637. doi: 10.1002/brb3.637
49. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. (2011) 23:598–604. doi: 10.1016/j.coi.2011.08.003
50. Tanaka M, Kikuchi H, Ishizu T, Minohara M, Osoegawa M, Motomura K, et al. Intrathecal upregulation of granulocyte colony stimulating factor and its neuroprotective actions on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. (2006) 65:816–25. doi: 10.1097/01.jnen.0000232025.84238.e1
51. Ngo ST, Steyn FJ, Huang L, Mantovani S, Pfluger CM, Woodruff TM, et al. Altered expression of metabolic proteins and adipokines in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. (2015) 357:22–7. doi: 10.1016/j.jns.2015.06.053
52. Garbuzova-Davis S, Ehrhart J, Sanberg PR, Borlongan CV. Potential role of humoral IL-6 cytokine in mediating pro-inflammatory endothelial cell response in amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Mol Sci*. (2018) 19:E423. doi: 10.3390/ijms19020423
53. Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP, Cheng Y. Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol*. (2016) 73:1316–24. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.2742
54. Lai KSP, Liu CS, Rau A, Lanctot KL, Kohler CA, Pakosh M, et al. Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. (2017) 88:876–82. doi: 10.1136/jnnp-2017-316201
55. Pedersen BK. Muscle as a secretory organ. *Compr Physiol*. (2013) 3:1337–62. doi: 10.1002/cphy.c120033
56. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. (2000) 52:145–76.
57. Subileau EA, Rezaie P, Davies HA, Colyer FM, Greenwood J, Male DK, et al. Expression of chemokines and their receptors by human brain endothelium: implications for multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. (2009) 68:227–40. doi: 10.1097/NEN.0b013e318197eca7
58. Yang X, Gao L, Wu X, Zhang Y, Zang D. Increased levels of MIP-1alpha in CSF and serum of ALS. *Acta Neurol Scand*. (2016) 134:94–100. doi: 10.1111/ane.12513
59. Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL, et al. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron*. (2005) 45:345–51. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.040
60. Mi S. Troy/Taj and its role in CNS axon regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. (2008) 19:245–51. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.04.007
61. Sun L, Liu S, Sun Q, Li Z, Xu F, Hou C, et al. Inhibition of TROY promotes OPC differentiation and increases therapeutic efficacy of OPC graft for spinal cord injury. *Stem Cells Dev*. (2014) 23:2104–18. doi: 10.1089/scd.2013.0563
62. Cui Y, Masaki K, Yamasaki R, Imamura S, Suzuki SO, Hayashi S, et al. Extensive dysregulations of oligodendrocytic and astrocytic connexins are associated with disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neuroinflamm*. (2014) 11:42. doi: 10.1186/1742-2094-11-42
63. Seckic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, Wagner M, Sun Y, et al. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. (2017) 133:887–906. doi: 10.1007/s00401-017-1687-9

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Moreno-Martínez, de la Torre, Toivonen, Zaragoza, García-Redondo, Calvo and Osta. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Role of IL-6 in Amyotrophic Lateral Sclerosis

Moreno-Martínez, L.; Calvo, A.C.; Moreno-García, L.; García-Salamero, G;
Zaragoza, P.; García-Redondo, A.; Osta, R.

En preparación.

Abstract

IL-6 is an inflammatory cytokine whose deregulation has been linked to a variety of neurodegenerative diseases, such as ALS. The aim of this work was to study the variation of IL-6 levels in damaged tissues during the course of the disease in the SOD1G93A animal model, and to assess the alteration of this cytokine in blood from ALS patients. We studied IL-6 protein expression in spinal cord, EDL muscle and SOL muscle from SOD1G93A mice at four stages of the disease by western blot. In addition, we analyzed gene and protein IL-6 levels in blood from ALS patients, healthy subjects and patients with other neuropathies through RTqPCR and ELISA. The results revealed different expression patterns depending on both the tissue analyzed and the stage of the disease, showing increasing IL-6 expression in EDL over time. Moreover, lower IL-6 levels in blood were found in ALS patients. The decreased gene and protein levels of IL6 in blood from ALS patients could suggest that IL6 might not be the main pro-inflammatory biomarker in the last stages in this tissue, in accordance with the findings obtained in the spinal cord of the animal model. In contrast, IL-6 may play a main role in fast glycolytic muscle fibers associated with muscle atrophy.

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by a progressive motor neuron degeneration leading to muscle paralysis and death within 2-5 years after diagnosis. Although few patients have familial disease, the cause of the majority of ALS cases is unknown [1]. To date, there are two treatments approved for ALS, riluzole and edaravone, although they only extend life expectancy for few months [2]. ALS is considered a heterogeneous disease with multiple pathological mechanisms involved, such as impaired protein homeostasis, aberrant RNA metabolism, excitotoxicity, mitochondrial dysfunction or neuroinflammation [3].

Inflammation has been widely studied during the last two decades evidencing its key role in the progression of ALS. A complex interplay between immune cells and their mediators seems to promote either disease progression or neuroprotection [4]. A better understanding of this challenging scenario could shed light on the inflammatory mechanisms which exacerbate the disease course and would help in the identification of new biomarkers and therapeutic targets. In this sense, numerous circulating cytokines have been found deregulated in ALS [5], suggesting they could be mediating diverse inflammatory pathways. One of the cytokines most frequently found altered is interleukin (IL)-6. IL-6 has pleiotropic functions and can exert both pro-inflammatory and anti-inflammatory actions in different tissues and organs [6]. Regarding ALS, in the SOD1G93A mouse model we found that increased IL-6 levels in plasma measured at the symptomatic and terminal stages were correlated with the longevity of mice, suggesting that higher levels of IL-6 could be associated with faster progression of the disease [7]. In addition, multiple studies have assessed IL-6 protein levels in blood from ALS patients and controls, obtaining very variable results. Unlike blood, few studies addressed the cytokine profile in tissues, leaving an open field to explore.

Given the little knowledge about the cytokine status in tissues different from blood, in this work we analyzed in the SOD1G93A mouse model the protein expression of IL-6 in spinal cord and skeletal muscle at four stages of the disease. Moreover, we studied IL-6 expression at protein and gene level in blood from a cohort of ALS patients to shed light on the support for diagnosis role of IL6 at clinical level.

Materials and methods

Animals and sampling

Transgenic mice were obtained by mating hemizygous B6SJL-Tg SOD1G93A males (stock number 002726) purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) with C57BL/6J x SJL/J F1 hybrid females (B6SJLF1) purchased from Janvier Labs (Saint- Berthevin Cedex, France). The offspring were identified by PCR assay as described in The Jackson Laboratory protocol. The mice were housed at the animal facilities in Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) under a standard light:dark (12:12) cycle. Food and water were provided ad libitum.

Spinal cord, extensor digitorum longus (EDL) muscle and soleus (SOL) muscle were isolated from a total of thirty-two wildtype (WT) and SOD1G93A mice and their controls after euthanized with CO₂ at four stages of the disease: pre-symptomatic (P40), early symptomatic (P60), symptomatic (P90) and late symptomatic (P120). These tissues were immediately frozen in dry ice and stored at -80°C until its processing.

All procedures were approved by the Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza. The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Experimental design involving patients

This study included a total of sixty participants divided in three groups: twenty ALS patients, twenty healthy controls and twenty patients with other neuropathies (ONP) originating from the Clinical Center NEMO, Milan, Italy. The clinical characteristics of the participants in each group were firstly assessed. In the ALS group, these characteristics included the revised ALS Functional Rating Scale-revised (ALSF_{RS}-r), the age at onset, age at sampling, gender, the onset site and the genetic diagnosis (Table 1). The ALSF_{RS}-r provided an estimation of the patient's degree of functional impairment.

Blood samples from ALS patients, ONP patients and control subjects were received frozen in PAXgene™ tubes (BD Biosciences, USA), which were stored at -80 °C until used. Blood samples from patients were obtained with written informed consent prior to inclusion in the study, which has been conducted according to Declaration of Helsinki principles, and following the Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council. Participants were

identified by number, not by name. Procedures with the samples were approved by the Ethics Committee for Clinical Research of Aragon (CEICA) (PI18/078).

Western blotting

Spinal cord, EDL and SOL from eight WT and SOD1G93A mice, per stage, were ground into a powder using the Tissue Lyser LT (Qiagen). Then, powdered tissues were resuspended in RIPA lysis buffer together with protease inhibitors (SC-24948, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) according to manufacturer's protocol. Total protein was quantified using the BCA method (Sigma-Aldrich). A total of 30 µg of protein was loaded into a 10% SDS-PAGE gel to analyze the protein expression of IL-6. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane (Amersham™, GE Healthcare Life Sciences) and subsequently blocked with a Tris-buffered saline solution containing 5% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Tween as supplement for 1 h at room temperature. Then, membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody for IL-6 (PK-AB815-61632M, Promokine). The housekeeping proteins selected to normalize the results were actin beta actin (ACTB) (PA1-183, Thermo Fisher Scientific) for spinal cord samples, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (PK-AB718-3781, Promokine) for muscle samples. SecOMPary antibody used was goat anti-Rabbit IgG (31466, Thermo Fisher Scientific). Finally, chemiluminescence detection was performed using Immobilon Crescendo Western HRP Substrate (Millipore) in a Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 system. The computer-assisted analysis of the bands was performed with AlphaEase FC software (Bonsai Technologies Group, S.A., Madrid, Spain).

RTqPCR

The PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytiX, 8634 Hombrechtikon, Switzerland) was used to extract the RNA fraction from blood samples from ALS patients (n=18), ONP patients (n=20) and healthy subjects (n=20), following the manufacturer's instructions. Afterwards, cDNA was synthesized using the kit qScript™ cDNA SuperMix (Quanta BioScience, Inc.). Following this, gene expression of IL-6 was quantified through qPCR using the TaqMan® probe for IL-6 (Hs00985639_m1, Applied Biosystems Inc.) mixed with TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.). Three endogenous genes, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Hs99999905_m1), hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) (Hs02800695_m1), and TATA-binding protein, (TBP) (Hs00427620_m1) were used to normalize the target gene expression. The $\Delta\Delta CT$ method was used to determine relative changes in transcriptional expression [8].

ELISA

The same samples used in the qPCR analysis were analyzed to perform ELISA assays. Blood in PAXgene™ tubes from patients was centrifuged at the initial step and the plasma phase was collected in new tubes. In this plasma phase, IL-6 protein expression was measured through an ELISA (BMS213-2, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) in those plasma samples from ALS patients (n=14), ONP patients (n=20) and healthy subjects (n=18). The protocol was performed following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Results obtained in the western blot analysis and RTqPCR were compared using t-tests or Mann-Whitney U-tests, depending on the data distribution analyzed by Shapiro-Wilk test. Chi-squared test was used to analyze the results obtained in the ELISA used to measure IL-6 in plasma samples from ALS patients. Statistical analysis was performed using SPSS (version 20, IBM, Armonk, NY). All of the values were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) or standard deviation (SD). Significance levels were set at $p < 0.05$.

Results

Expression of IL-6 varies along disease and tissue in SOD1G93A mice

Protein expression of IL-6 was studied in two of the most affected tissues in the disease: spinal cord and skeletal muscle. The western blot revealed different patterns of expression depending on both the stage of the disease and the tissue studied (Figure 1). Regarding the spinal cord, lower levels of IL-6 were found in SOD1G93A mice at P40 and P120 compared to the levels obtained in WT mice. On the other hand, two different skeletal muscles were studied: the fast-twitch EDL muscle and the slow-twitch SOL muscle. In EDL we could observe that IL-6 expression was increased in the SOD1G93A mice from the early symptomatic stage (P60) to the terminal stage. In contrast, we found a little tendency ($p < 0.067$) for IL-6 to be increased in SOL from SOD1G93A mice at P40, although the levels were similar in WT and SOD1G93A mice at the other stages of the disease.

IL-6 gene expression was downregulated in blood from ALS patients

Gene expression of IL-6 was measured in blood from ALS patients, ONP patients and control subjects by qPCR. The analysis showed a significant decreased of IL-6 levels in the ALS patients group compared to levels found in both ONP patients and healthy subjects groups (Figure 2).

Absence of IL-6 protein levels in blood was associated with ALS

IL-6 protein levels were analyzed in blood from ALS patients, ONP patients and healthy subjects. After performing the ELISAs, we observed in several samples that IL-6 levels were under the limit of detection of the assay. Given that IL-6 protein concentration was well quantified in half of the samples, we considered that there was very little or null IL-6 protein in those samples that the expression was not detected. Thus, we analyzed the association of the presence (detection) or absence (no detection) of IL-6 with ALS patients, ONP patients and control group. The statistical analysis using Chi-squared test revealed a significant relation between the absence of IL-6 in blood and the ALS patients group, $\chi^2(2, N = 52) = 7.241, p = 0.027$. The proportion of ALS patients where IL-6 was not detected was 0.9, whereas the proportions found for ONP and control patients were 0.6 and 0.5, respectively (Figure 3).

Discussion

The cytokine IL-6 has been widely studied in a wide range of neurodegenerative disorders, including ALS. However, there is still the need to elucidate the exact role of IL-6 during the disease in different tissues. In this work we have analyzed the IL-6 protein expression in two of the most damaged tissues in the SOD1G93A mouse model, the spinal cord and the skeletal muscle, at different stages of the disease to assess its evolution over time. In addition, we have measured IL-6 gene and protein expression levels in blood from ALS patients to study whether or not IL-6 could be considered a marker of the peripheral inflammatory response in ALS.

Our results showed lower IL-6 protein levels in spinal cord at the pre-symptomatic and terminal stages in SOD1G93A mice. On the one hand, this finding supports the early anti-inflammatory or neuroprotective compensatory response found in CNS [9]. On the other hand, the decreased expression found at the final stage is not in accordance with a unique previous study reporting increased IL-6 levels in the spinal cord of SOD1G93A mice [10]. An explanation for the lower levels of IL-6 found may be that the progressive change to a pro-inflammatory status occurring in later stages of ALS could be governed through other pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β

and tumor necrosis factor (TNF)- α [11], having IL-6 a less relevant effect. On the other hand, the inflammatory status occurring in the terminal stage in ALS could be explained by higher IL-6 mRNA expression, which could not be translated to protein due to the aberrant RNA processing occurring in ALS, as previously observed in the SOD1G93A mouse model [12]. Nevertheless, very little has been found in the literature about the evolution of this cytokine in the spinal cord in ALS over time and further research could help to better understand the role of this mediator in the spinal cord.

Regarding the skeletal muscle, we found increasing levels of IL-6 from the symptomatic stage to the terminal stage in EDL, but not in SOL. Unlike SOL, EDL is mostly composed of fast-twitch and glycolytic fibers. Previous studies have shown that IL-6 is a myokine whose expression is affected by fiber type [13, 14]. For example, under no disease condition, IL-6 release was only inducible from SOL but not EDL muscle, leading to higher IL-6 protein levels in slow oxidative muscle fibers [13]. However, fast glycolytic fibers (EDL) are more vulnerable than slow-twitch oxidative fibers (SOL) under a variety of atrophic conditions [15], such as those occurring in ALS. In addition, in ALS, activated inflammation and abnormal glial responses occur in the limb muscle [16]. Therefore, our finding showing an unusual increase of IL-6 in EDL could indicate that the inherent pathological processes of ALS are responsible for this stimulation. In addition, IL-6 can perform as an anti-inflammatory myokine [17], suggesting that increased IL-6 release could represent a neuroprotective reaction against the excitotoxic damage [18], as observed in an ALS animal model [19]. In this sense, the progressive muscle atrophy may be accompanied by increasing IL-6 levels in EDL reflecting the damage suffered by this type of muscles. Interestingly, inactivation of STAT3-IL6 signaling in fibro-adipogenic progenitors, activated in response to muscle injury, effectively countered muscle atrophy and fibrosis in mouse models of acute denervation and SODG93A mice [20]; this suggests that IL-6 could be a potential target to be considered in ALS therapies.

In relation to circulating IL-6, we analyzed both gene and protein expression of IL-6 in blood samples from patients. We found significant lower levels of IL-6 mRNA in ALS patients compared to the levels obtained in healthy subjects and ONP patients. This result is in agreement with a previous study where they found a downregulation of IL6 gene expression in the peripheral blood of sporadic ALS patients [21]. Similarly, at protein level we found that the absence of IL-6 in blood was significantly associated with the ALS patients group. Despite this association, the no detection of IL-6 could be caused by the very low concentration of this protein found in blood due to the method used to collect the blood samples, PAX tubes, which could be interfering in

the integrity of this cytokine. In addition, the few mRNA transcripts found in blood of ALS patients could be missed in the translation to protein due to a dysfunction in the RNA processing, which is similar to our findings related to the spinal cord of the mouse model.

A great variability of protein levels of this cytokine in blood has been found in the literature. Although many studies reported that higher levels were associated with ALS and correlated with faster progression of the disease course [5, 19, 22-25], others found no significant differences [4, 26, 27] or even decreasing IL-6 levels in ALS patients over time [28]. These controversial results suggest that this inflammatory mediator could be susceptible to variations due to processes not dependent on ALS, e.g. the gender and obesity [29]. In addition, a recent study reported blood IL-6 protein levels increased with aging in both ALS patients and healthy controls [4]. In the same study, they also found an association of higher IL-6 levels with respiratory dysfunction, proposing that this cytokine could be explored as a marker of respiratory failure [4]. Therefore, the instability of circulating IL-6 could become a barrier for its consideration by itself as a specific biomarker of ALS.

In our study, in the SOD1G93A mouse model we found increasing IL-6 levels in EDL, which could correlate with the atrophy progression, and could be an indicator of an anti-inflammatory response to damage, or it may be exacerbating the inflammatory status in the muscle. In ALS patients, we found lower circulating IL-6 levels associated with ALS, which could suggest that IL6 might not be the main pro-inflammatory mediator in the last stages in this tissue, in accordance with the findings obtained in the spinal cord of the animal model. Moreover, given the controversial results found in blood in the literature, we suggest that tissues damaged directly by the disease, such as the skeletal muscle predominantly composed of fast glycolytic muscle fibers, could provide a closer insight of the mechanisms involved in ALS. Accordingly, future studies focused on the study of the role of IL-6 in the skeletal muscle of ALS patients by muscle biopsies could be significance. Although further research is needed to shed light on this, IL-6 could be a potential molecular target to modulate the imbalanced inflammatory status of the skeletal muscle in ALS.

Author's Contributions

AC, AG-R, PZ and RO were implied in the experimental design. LM-M, LM-G and GG-S performed the experimental work. AC, LM-M and RO interpreted the data and performed the statistical analysis. AC and LM-M were major contributors in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research was funded by Instituto de Salud Carlos III (Grant PI17/00949) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” from the European Union, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-612), Fundación FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras), and Consolidated Groups from Gobierno de Aragón. LM-M is supported by Departamento de Industria e Innovación from Gobierno de Aragón and Fondo Social Europeo.

Acknowledgments

We acknowledge Instituto de Salud Carlos III, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” from the European Union, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Fundación FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras), Consolidated Groups from Gobierno de Aragón, and Fondo Social Europeo for their funding.

References

1. Hardiman, O.; Al-Chalabi, A.; Chio, A.; Corr, E.M.; Logroscino, G.; Robberecht, W.; Shaw, P.J.; Simmons, Z.; van den Berg, L.H. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2017, 3, 17071, 10.1038/nrdp.2017.71 [doi].
2. Jaiswal, M.K. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med. Res. Rev.* 2019, 39, 733-748, 10.1002/med.21528 [doi].

3. Turner, M.R.; Hardiman, O.; Benatar, M.; Brooks, B.R.; Chio, A.; de Carvalho, M.; Ince, P.G.; Lin, C.; Miller, R.G.; Mitsumoto, H.; Nicholson, G.; Ravits, J.; Shaw, P.J.; Swash, M.; Talbot, K.; Traynor, B.J.; Van den Berg, L.H.; Veldink, J.H.; Vucic, S.; Kiernan, M.C. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 2013, 12, 310-322, 10.1016/S1474-4422(13)70036-X [doi].
4. Pronto-Laborinho, A.; Pinto, S.; Gromicho, M.; Pereira, M.; Swash, M.; de Carvalho, M. Interleukin-6 and amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2019, 398, 50-53, S0022-510X(19)30026-7 [pii].
5. Hu, Y.; Cao, C.; Qin, X.Y.; Yu, Y.; Yuan, J.; Zhao, Y.; Cheng, Y. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. *Sci. Rep.* 2017, 7, 9094-017-09097-1, 10.1038/s41598-017-09097-1 [doi].
6. Scheller, J.; Chalaris, A.; Schmidt-Arras, D.; Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1813, 878-888, 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034 [doi].
7. Moreno-Martinez, L.; de la Torre, M.; Toivonen, J.M.; Zaragoza, P.; Garcia-Redondo, A.; Calvo, A.C.; Osta, R. Circulating Cytokines Could Not Be Good Prognostic Biomarkers in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Immunol.* 2019, 10, 801, 10.3389/fimmu.2019.00801 [doi].
8. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25, 402-408, 10.1006/meth.2001.1262 [doi].
9. Hooten, K.G.; Beers, D.R.; Zhao, W.; Appel, S.H. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* 2015, 12, 364-375, 10.1007/s13311-014-0329-3 [doi].
10. Hensley, K.; Fedynyshyn, J.; Ferrell, S.; Floyd, R.A.; Gordon, B.; Grammas, P.; Hamdheydari, L.; Mhatre, M.; Mou, S.; Pye, Q.N.; Stewart, C.; West, M.; West, S.; Williamson, K.S. Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 2003, 14, 74-80, S0969996103000871 [pii].

11. Jeyachandran, A.; Mertens, B.; McKissick, E.A.; Mitchell, C.S. Type I Vs. Type II Cytokine Levels as a Function of SOD1 G93A Mouse Amyotrophic Lateral Sclerosis Disease Progression. *Front. Cell. Neurosci.* 2015, 9, 462, 10.3389/fncel.2015.00462 [doi].
12. Manzano, R.; Toivonen, J.M.; Calvo, A.C.; Olivan, S.; Zaragoza, P.; Rodellar, C.; Montarras, D.; Osta, R. Altered in vitro proliferation of mouse SOD1-G93A skeletal muscle satellite cells. *Neurodegener Dis.* 2013, 11, 153-164, 10.1159/000338061 [doi].
13. Liang, A.P.; Drazick, A.T.; Gao, H.; Li, Y. Skeletal muscle secretion of IL-6 is muscle type specific: Ex vivo evidence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, 505, 146-150, S0006-291X(18)31960-0 [pii].
14. Jia, W.H.; Wang, N.Q.; Yin, L.; Chen, X.; Hou, B.Y.; Qiang, G.F.; Chan, C.B.; Yang, X.Y.; Du, G.H. Effect of skeletal muscle phenotype and gender on fasting-induced myokine expression in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019, 514, 407-414, S0006-291X(19)30806-X [pii].
15. Wang, Y.; Pessin, J.E. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2013, 16, 243-250, 10.1097/MCO.0b013e328360272d [doi].
16. Van Dyke, J.M.; Smit-Oistad, I.M.; Macrander, C.; Krakora, D.; Meyer, M.G.; Suzuki, M. Macrophage-mediated inflammation and glial response in the skeletal muscle of a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Exp. Neurol.* 2016, 277, 275-282, S0014-4886(16)30006-1 [pii].
17. Pedersen, B.K.; Febbraio, M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* 2008, 88, 1379-1406, 10.1152/physrev.90100.2007 [doi].
18. Ali, C.; Nicole, O.; Docagne, F.; Lesne, S.; MacKenzie, E.T.; Nouvelot, A.; Buisson, A.; Vivien, D. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000, 20, 956-966, 10.1097/00004647-200006000-00008 [doi].
19. Lu, C.H.; Allen, K.; Oei, F.; Leoni, E.; Kuhle, J.; Tree, T.; Fratta, P.; Sharma, N.; Sidle, K.; Howard, R.; Orrell, R.; Fish, M.; Greensmith, L.; Pearce, N.; Gallo, V.; Malaspina, A. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm* 2016, 3, e244, 10.1212/NXI.0000000000000244 [doi].
20. Madaro, L.; Passafaro, M.; Sala, D.; Etxaniz, U.; Lugarini, F.; Proietti, D.; Alfonsi, M.V.; Nicoletti, C.; Gatto, S.; De Bardi, M.; Rojas-Garcia, R.; Giordani, L.; Marinelli, S.; Pagliarini, V.;

Sette, C.; Sacco, A.; Puri, P.L. Denervation-activated STAT3-IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat. Cell Biol.* 2018, 20, 917-927, 10.1038/s41556-018-0151-y [doi].

21. Andres-Benito, P.; Moreno, J.; Dominguez, R.; Aso, E.; Povedano, M.; Ferrer, I. Inflammatory Gene Expression in Whole Peripheral Blood at Early Stages of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Neurol.* 2017, 8, 546, 10.3389/fneur.2017.00546 [doi].

22. Ngo, S.T.; Steyn, F.J.; Huang, L.; Mantovani, S.; Pfluger, C.M.; Woodruff, T.M.; O'Sullivan, J.D.; Henderson, R.D.; McCombe, P.A. Altered expression of metabolic proteins and adipokines in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2015, 357, 22-27, 10.1016/j.jns.2015.06.053 [doi].

23. Blasco, H.; Garcon, G.; Patin, F.; Veyrat-Durebex, C.; Boyer, J.; Devos, D.; Vourc'h, P.; Andres, C.R.; Corcia, P. Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. *Can. J. Neurol. Sci.* 2017, 44, 90-95, 10.1017/cjn.2016.284 [doi].

24. Guo, J.; Yang, X.; Gao, L.; Zang, D. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS. *Brain Behav.* 2017, 7, e00637, 10.1002/brb3.637 [doi].

25. Prado, L.G.R.; Rocha, N.P.; de Souza, L.C.; Bicalho, I.C.S.; Gomez, R.S.; Vidigal-Lopes, M.; Braz, N.F.T.; Vieira, E.L.M.; Teixeira, A.L. Longitudinal assessment of clinical and inflammatory markers in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2018, 394, 69-74, S0022-510X(18)30354-X [pii].

26. Vlam, L.; Stam, M.; de Jager, W.; Cats, E.A.; van den Berg, L.H.; van der Pol, W.L. Cytokine profiles in multifocal motor neuropathy and progressive muscular atrophy. *J. Neuroimmunol.* 2015, 286, 1-4, 10.1016/j.jneuroim.2015.06.008 [doi].

27. Martinez-Merino, L.; Iridoy, M.; Galbete, A.; Roldan, M.; Rivero, A.; Acha, B.; Irun, P.; Canosa, C.; Pocovi, M.; Mendioroz, M.; Jerico, I. Evaluation of Chitotriosidase and CC-Chemokine Ligand 18 as Biomarkers of Microglia Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2018, 18, 208-215, 10.1159/000490920 [doi].

28. Ehrhart, J.; Smith, A.J.; Kuzmin-Nichols, N.; Zesiewicz, T.A.; Jahan, I.; Shytle, R.D.; Kim, S.H.; Sanberg, C.D.; Vu, T.H.; Gooch, C.L.; Sanberg, P.R.; Garbuzova-Davis, S. Humoral factors in ALS patients during disease progression. *J. Neuroinflammation* 2015, 12, 127-015-0350-4, 10.1186/s12974-015-0350-4 [doi].

29. Martínez-García, M.A.; Moncayo, S.; Insenser, M.; Montes-Nieto, R.; Fernández-Durán, E.; Álvarez-Blasco, F.; Luque-Ramírez, M.; Escobar-Morreale, H.F. Postprandial inflammatory responses after oral glucose, lipid and protein challenges: Influence of obesity, sex and polycystic ovary syndrome. *Clin. Nutr.* 2019, S0261-5614(19)30141-4 [pii].

Figures and tables

Table 1. General and clinical characteristics of the subjects involved in the study. All ALS patients showed 48 of ALSFRS-r at the moment of taking the simple and present mutations in the following genes: Sod1, Fus, Tardbp and C9orf72.

Patients' characteristics	ALS patients (n=20)	ONP patients (n=20)	Control subjects (n=20)
Gender (n)	13 males 7 females	12 males 8 females	7 males 13 females
Age at illness onset (mean \pm SD)	64 \pm 8.43		
Disease duration, months (mean \pm SD)	26 \pm 17.56		
Age at sampling (mean \pm SD)	66 \pm 8.67	56 \pm 12.08	61 \pm 9.56
Site at illness onset (n patients)			
<i>Bulbar</i>	4		
<i>Upper limb</i>	5		
<i>Lower limb</i>	8		
<i>Generalized</i>	2		
<i>Respiratory</i>	1		

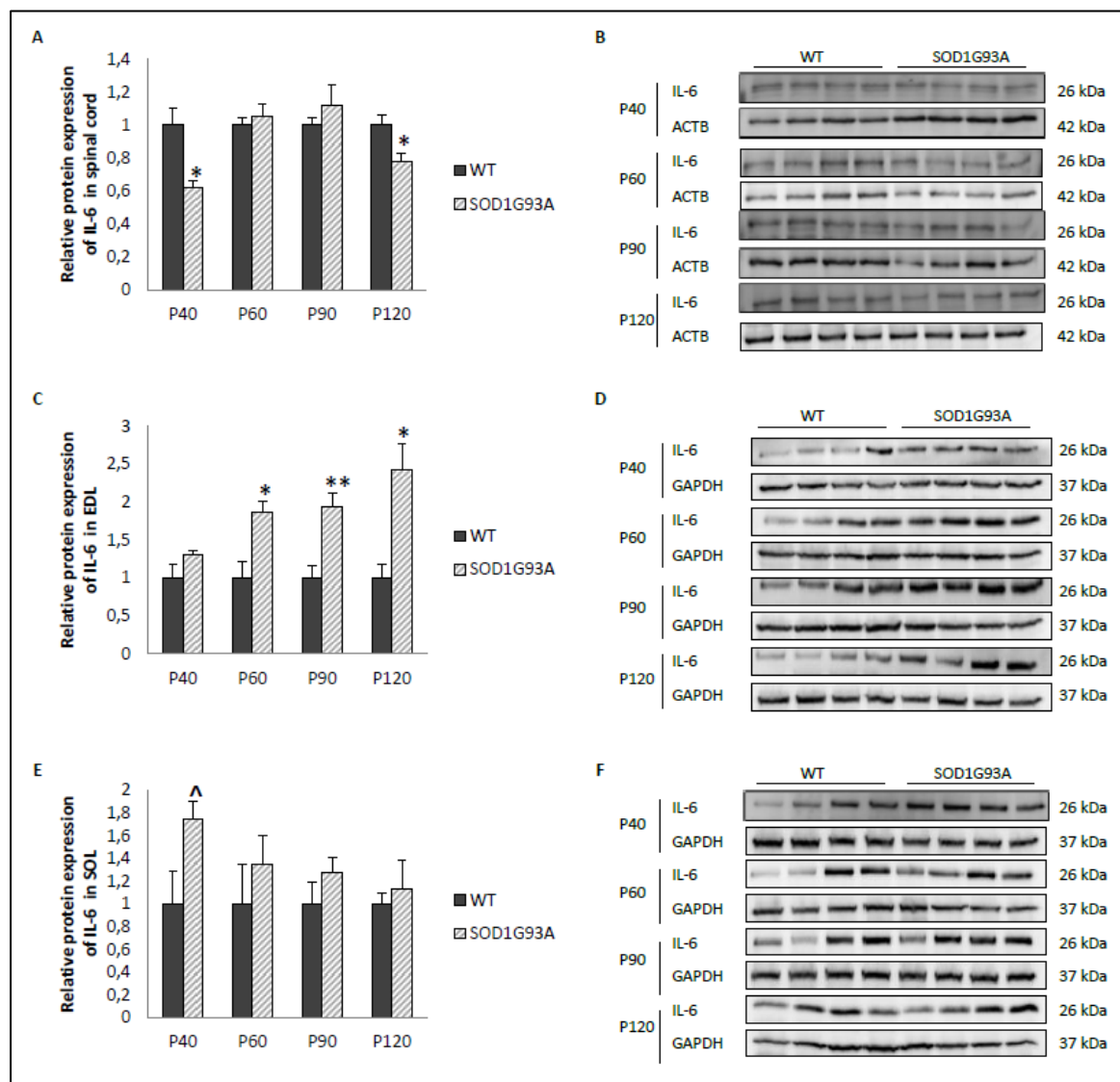


Figure 1. Relative protein expression of IL-6 in spinal cord, EDL and SOL from WT and SOD1G93A transgenic mice at P40, P60, P90 and P120. Protein expression of IL-6 was analyzed in spinal cord (A, B), EDL (C, D) and SOL (E, F). The sample size was 4 WT and 4 SOD1G93A mice. Unrelated t-test or Mann-Whitney U-tests were used. Graphics show relative mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $\Delta p < 0.10$.

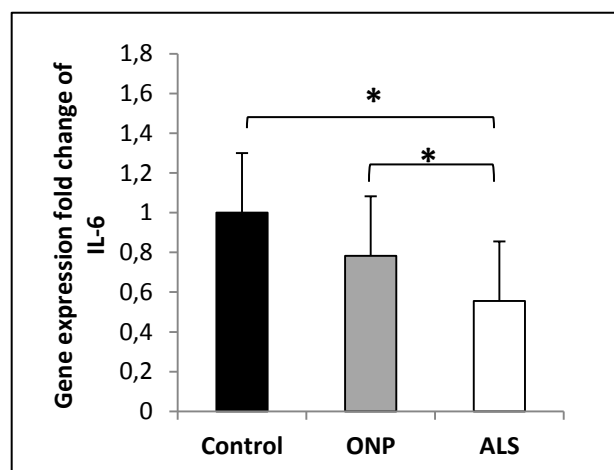


Figure 2. IL-6 gene expression was downregulated in blood from ALS patients. Gene expression of IL-6 was measured by qPCR in 18 ALS patients, 20 ONP patients and 20 control subjects. Unrelated t-test test was used. Graphic shows relative mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$.

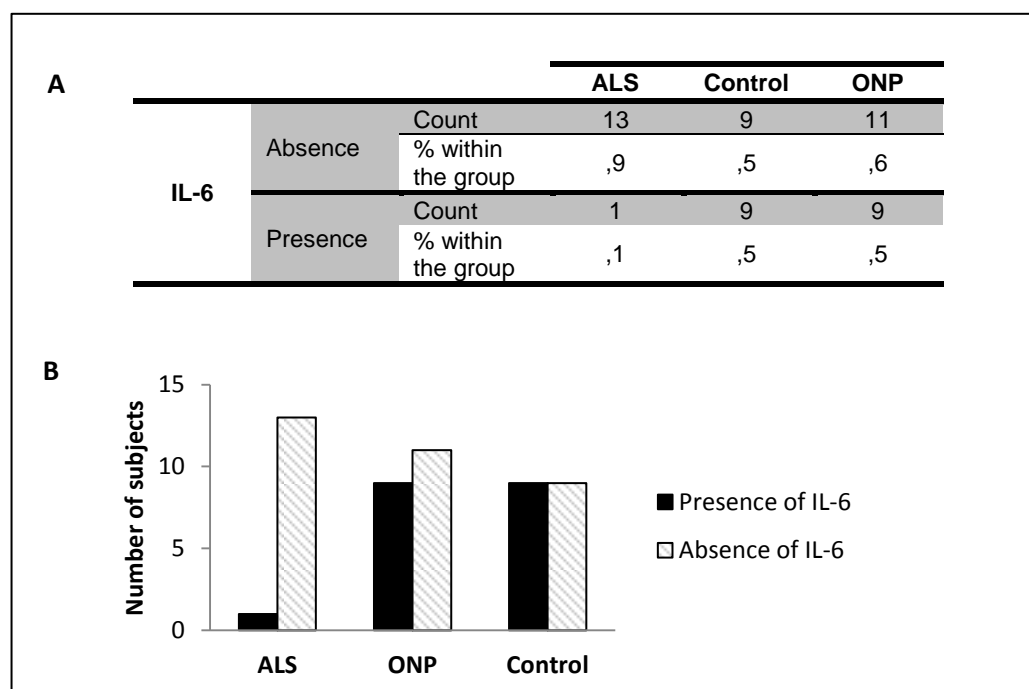


Figure 3. Number of subjects showing presence or absence of IL-6 in their blood and grouped by the disease condition. The relation between the presence/absence of IL-6 in blood of ALS patients ($n=14$), ONP patients ($n=20$) and controls ($n=18$) was evaluated by a Chi-squared test (A). The difference in proportions was found significant, $\chi^2(2, N = 52) = 7.241$, $p = 0.027$. Graphic shows absolute number of subjects (B).

Neuroprotective fragment C of tetanus toxin modulated inflammation in an ALS mouse model.

Moreno-Martínez, L.; de la Torre, M; Muñoz, M.J.; Zaragoza, P.; Aguilera, J.; Calvo, A.C.; Osta R.

En preparación.

Abstract

Neuroinflammation plays a significant role in ALS pathology, which has led to the development of therapies targeting inflammation in the last years. Our group has studied the tetanus toxin C-terminal fragment (TTC) as a therapeutic molecule in ALS, showing neuroprotective properties in the SOD1G93A mouse model. However, it is unknown whether TTC could have some effect on inflammatory mechanisms. The objective of this study was to assess the effect of TTC on the regulation of inflammatory mediators to elucidate its potential role in modulating inflammation occurring in ALS. After TTC treatment in SOD1G93A mice, levels of eotaxin-1, IL-2, IL-6 and MIP-1 α and galectin-1 were analyzed by immunoassays in plasma samples, whilst protein expression of caspase-1, IL-1 β , IL-6 and NLRP3 was measured in spinal cord, EDL and SOL. The results showed reduced levels of IL-6 in plasma, spinal cord, EDL and SOL in treated SOD1G93A mice. In addition, TTC showed a different role in the modulation of NLRP3 and caspase-1 depending on the tissue analyzed. In conclusion, our results suggest that TTC could have a potential anti-inflammatory effect by reducing IL-6 levels in tissues drastically affected by the disease. However, further research is needed to study more in depth the anti-inflammatory effect of TTC in ALS.

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease characterized by the loss of the cortex, brainstem, and spinal cord motor neurons (MNs). This motoneuron degeneration leads to muscle paralysis and, finally, premature death due to respiratory failure within 2–5 years after diagnosis. There is currently no cure for the disease, although some drugs are used to slow disease progression, such as riluzole, and more recently, edaravone and masitinib [1]. Despite the numerous pathologic mechanisms proposed, the etiology of the majority of ALS cases, sporadic ALS (sALS), is unknown.

Neuroinflammation is a relevant hallmark in ALS pathology and it is characterized by microglial activation, astrogliosis, infiltration of T lymphocytes and monocytes, and overproduction of inflammatory cytokines [2-4]. It has been suggested that inflammatory factors may modulate the disease progression and survival rate in ALS. Accordingly, a wide range of pro-inflammatory mediators, such as interleukins, have been deeply studied in the last years with the purpose of identifying a panel useful to predict the disease course. The interleukins most frequently found dysregulated in ALS were IL-2, IL-6 and IL-17 [5], although there are some controversial results that question the role of these cytokines as reliable biomarkers. More recently, another mechanism associated with the immune system, the NLRP3 inflammasome, has been studied in ALS showing its involvement in the disease [6-8]. NLRP3 inflammasome is an essential mechanism involved in immune responses through the activation of caspase-1 leading to the maturation of IL-1 β and IL-18, and the induction of pyroptosis [9]. The cause of the participation of NLRP3 inflammasome in ALS could underlie in the misfolded protein aggregates found in ALS, as they could become damage-associated molecular patterns (DAMPs) and cause direct activation of NLRP3, following the activation of cytokines [10]. In an attempt to modulate the inflammatory mechanisms in ALS, therapies targeting inflammation have emerged in the last years showing promising results, such as the infusion of regulatory T cells (Tregs) [11-13].

In view of this, it becomes vital to find therapies aimed to control the dysregulation of the immune system in ALS to mitigate the inflammatory responses that result harmful in the disease. Our group has been studying the potential role of the tetanus toxin C-terminal fragment (TTC) as a therapeutic molecule in ALS during the last decade. Its non-toxic nature and neuroprotective properties have made TTC a potential carrier molecule through the nervous system as well as a therapeutic molecule for neurological disorders [14, 15]. Especially in the SOD1G93A mouse model, we demonstrated that TTC treatment ameliorated the decline of

hindlimb muscle innervation, significantly delayed the onset of symptoms and functional deficits, improved spinal motor neuron survival, and prolonged lifespan [16].

Despite the participation of TTC in several mechanisms dysregulated in ALS, such as apoptosis, it is unknown whether TTC could have some effect at the immunological or inflammatory level. Thus, the aim of this work was to study the possible anti-inflammatory effect of TTC in the SOD1G93A mouse model by studying its effect on the regulation of some pro-inflammatory cytokines previously described altered in ALS, and on NLRP3 inflammasome proteins.

Materials and methods

Animals

Transgenic mice were obtained by mating hemizygous B6SJL-Tg SOD1G93A males (stock number 002726) purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) with C57BL/6J x SJL/J F1 hybrid females (B6SJLJF1) purchased from Janvier Labs (Saint-Berthevin Cedex, France). The offspring were identified by PCR assay as described in The Jackson Laboratory protocol. The mice were housed at the animal facilities in Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) under a standard light:dark (12:12) cycle. Food and water were provided ad libitum.

All procedures were approved by the Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza. The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Treatment with recombinant TTC protein

Recombinant TTC protein was kindly provided by José Aguilera from UAB, CIBERNED, Barcelona, Spain. Twelve SOD1G93A mice were injected via intramuscular with 1 µg of TTC recombinant protein at P55, corresponding to the early symptomatic stage. Simultaneously, twelve SOD1G93A mice were injected with phosphate-buffered saline (PBS) as the control group. Groups were sex-balanced and littermates were equally distributed in both groups. Injections were made weekly until P110, when they were euthanized to proceed to collect the samples.

Sample collection

Serial plasma samples were taken from the twenty four mice at three stages: P60, P90 and P110. Plasma samples at P60 and P90 were obtained from submandibular bleeding, whilst those at terminal stage were collected from blood extracted by cardiac puncture immediately after euthanasia. Blood was extracted and transferred to EDTA coated mini vacutainer tubes (BD Biosciences, USA). Then, blood was centrifuged at 3,000 rpm for 10min at 4°C within 30 min from extraction, plasma was collected and immediately frozen in dry ice and stored at -80°C.

Spinal cord and two different skeletal muscles, extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL), were isolated from SOD1G93A mice after euthanized with CO₂ at P110. These tissues were immediately frozen in dry ice and stored at -80°C until its processing.

ELISA and Multiplex immunoassays

Levels of eotaxin-1, IL-2, IL-6 and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha (α) were analyzed by multiplex immunoassay (ProcartaPlex Multiplex Immunoassay, Affymetrix eBioscience, Thermo Fisher Scientific Inc.) and galectin-1 levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Boster Biological Technology) in serial plasma samples from eleven (in multiplex) and twenty two (in ELISA) control and TTC-treated SOD1G93A mice at the three different stages of the disease.

Western blotting

Spinal cord, EDL and SOL from eight control and TTC-treated SOD1G93A mice were ground into a powder using the Tissue Lyser LT (Qiagen). Then, powdered tissues were resuspended in RIPA lysis buffer together with protease inhibitors (SC-24948, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) according to manufacturer's protocol. Total protein was quantified using the BCA method (Sigma-Aldrich). A total of 30 μ g of protein was loaded into a 10% SDS-PAGE gel to analyze the protein expression of caspase-1, IL-1 β , IL-6 and NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3). After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane (Amersham™, GE Healthcare Life Sciences) and subsequently blocked with a Tris-buffered saline solution containing 5% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Tween as supplement for 1 h at room temperature. Then, membranes were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: caspase-1 (sc-1218-R, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), IL-1 β (sc-7884, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), IL-6 (PK-AB815-61632M, Promokine) and NLRP3 (sc-66846, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA). The housekeeping protein selected to normalize the results was actin beta actin (ACTB) (PA1-183, Thermo Fisher Scientific). Secondary antibody used

was goat anti-Rabbit IgG (31466, Thermo Fisher Scientific). Finally, chemiluminescence detection was performed using Immobilon Crescendo Western HRP Substrate (Millipore) in a Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 system. The computer-assisted analysis of the bands was performed with AlphaEase FC software (Bonsai Technologies Group, S.A., Madrid, Spain).

Statistical analysis

Results obtained in immunoassays were compared between the treated and control SOD1G93A groups using t-tests or Mann-Whitney U-tests, according to data distribution analyzed by Shapiro-Wilk test. Statistical analysis was performed using SPSS (version 20, IBM, Armonk, NY) and GraphPad Prism Software (version 5, La Jolla, CA). All of the values were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Significance levels were set at $p < 0.05$.

Results

TTC reduces IL-6 levels in plasma from SOD1G93A mice at the symptomatic stage

Protein levels of eotaxin-1, galectin-1, IL-2, IL-6 and MIP-1 α were analyzed in serial plasma samples from SOD1G93A mice under TTC treatment and their controls (Table 1). The results obtained showed reduced levels of IL-6 at the symptomatic stage (P90) in mice inoculated with TTC (Figure 1). We did not observe other statistically significant differences in the levels of the other cytokines measured when comparing the two groups of mice.

TTC differently modulates the expression of NLRP3, caspase-1 and IL-6 in spinal cord and two types of skeletal muscle fibers from SOD1G93A mice

Caspase-1, IL-1 β , IL-6 and NLRP3 protein expression was quantified in spinal cord, EDL and SOL from SOD1G93A mice treated with TTC and their controls at a late stage of the disease (Figure 2). The western blot assay showed that the levels of IL-6 and NLRP3 in spinal cord and SOL were decreased in the group of mice under TTC treatment compared to their controls. Similarly, we found a downregulation of IL-6 in EDL in the TTC-treated group of mice. In contrast, we could observe different effect of TTC depending on the muscle. NLRP3 protein levels were not found decreased in EDL from the TTC-treated group. On the other hand, caspase-1 was found decreased in EDL and increased in SOL from mice treated with TTC.

Discussion

Neuroinflammation is a significant feature of ALS pathogeny. Therefore, the development of therapies that can modulate the inflammatory mechanisms arisen in ALS could be helpful in the fight with this disease. Previous studies have demonstrated the positive effect of TTC in the SOD1G93A mouse model by protecting against spinal motor neuron loss, reducing microgliosis, delaying the onset of symptoms and prolonging lifespan [15, 16]. However, whether TTC could modulate the inflammation occurring in ALS is unknown. In this work, we studied the effect of a TTC-based therapy in the SOD1G93A transgenic mice on the regulation of several pro-inflammatory mediators in plasma, and also on NLRP3 inflammasome proteins in two of the most affected tissues in the disease: spinal cord and skeletal muscle.

IL-6 levels were measured in serial plasma samples from control and TTC-treated transgenic mice at three different stages of the disease. Concurrently, IL-6 protein expression was analyzed in spinal cord, EDL and SOL from these mice at a late stage of the disease. Our results showed a consistent downregulation of IL-6 levels in plasma at P90 and the other tissues analyzed at P110 from mice which received TTC injections. IL-6 is a cytokine involved in inflammation and the maturation of B cells, and it is principally produced at sites of acute and chronic inflammation. In relation to ALS, many studies have reported higher levels of IL-6 in blood from ALS patients compared to healthy patients [17-23]. However, there are works pointing out the large variability of this cytokine [24, 25], highlighting that this dysregulation does not seem to be specific to ALS [26, 27]. Despite the controversy found in blood from ALS patients, there is a previous study with the SOD1G93A murine model performed by our group, where we found a negative correlation between the expression of IL-6 in plasma at P90 and the survival rate [28], which is the same stage where we observed the TTC effect in plasma. This result suggests that TTC could ameliorate the altered inflammatory status which is found at the symptomatic stage of the disease. Similarly to plasma, we found that TTC also reduced the levels of IL-6 in spinal cord, EDL and SOL. These findings could imply that TTC may be helpful in counteracting the inflammatory mechanisms promoted by the activation of IL-6 in the most affected tissues in ALS.

Despite the large variability observed in the literature, the alteration of IL-6 in ALS patients and ALS animal models along disease course is frequent [5, 21]. Given that elevated levels of IL-6 can lead to a higher status of inflammation, strategies aimed at reducing this cytokine could be useful to modulate inflammation occurring in ALS. In this sense, several therapies showing some positive effects in the disease were also able to modulate IL-6 expression, suggesting that this modulation could help in the improvement of ALS pathology [29-31]. According to this, our

finding showing the effect of TTC downregulating the expression of IL-6 in plasma, spinal cord and skeletal muscle may suggest that TTC could have a role in palliating the disease course through reducing inflammation mediated by IL-6.

Apart from IL-6, other pro-inflammatory mediators were measured in serial plasma samples from the transgenic mice: eotaxin-1, galectin-1, IL-2 and MIP-1 α . The selection of these cytokines was based on a previous study where we found negative correlations between the levels of these proteins in plasma and the survival rate of the SOD1G93A transgenic mice [28]. Accordingly, other studies reported increased levels of eotaxin-1, IL-2 and MIP-1 α in plasma from ALS patients compared to healthy patients [19, 32-34]. However, we could not observe any difference in the levels of any of these proteins between the control group and the TTC-treated group. Although reducing these mediators could result of interest to elucidate their role in ameliorating the disease course, TTC did not seem to exert an effect on the modulation of the levels of these cytokines.

Expression of proteins belonging to NLRP3 inflammasome, particularly caspase-1, IL-1 β and NLRP3, was analyzed by western blot in spinal cord, EDL and SOL. We could observe different effects exerted by TTC depending on the tissue. NLRP3 was downregulated in both spinal cord and SOL from TTC-treated mice; in contrast, this significant change was not found in EDL. Regarding to caspase-1, we found a different regulation of TTC depending on the muscle: it was decreased in EDL, whereas it was upregulated in SOL. IL-1 β was also studied, but we could not find any change dependent on the TTC treatment. The contribution of NLRP3 inflammasome and its components in ALS pathogeny has been studied in the recent years [8, 10, 35]. For instance, it has been demonstrated to be activated in brain of SOD1G93A rats through an upregulation of the protein levels of NLRP3, caspase-1, IL-1 β and IL-18 compared to WT rats [7]. Similarly, it was found activated also in spinal cord from SOD1G93A mice and ALS patients [36]; specifically, NLRP3 was found increased only at a late stage of the disease in transgenic mice. According to our results, TTC reduced NLRP3 levels in spinal cord at P110, suggesting that TTC may modulate the late activation of NLRP3 in this tissue. On the other hand, lower caspase-1 gene expression in spinal cord in non-treated SOD1G93A mice was already described by our group, which is in accordance with our results [16].

The activation of the NLRP3 inflammasome in the skeletal muscle has been demonstrated as well, where increased levels of caspase-1 and IL-1 β were found in pre-symptomatic SOD1G93A mice, and they were elevated in denervated muscles from these mice and ALS patients [37]. According to our results, TTC could have a role in palliating the effects of active caspase-1 in SOL,

but not in EDL. The differences observed between both skeletal muscles could be explained by their opposed phenotypes: slow-twitch SOL and fast-twitch EDL, as they can show different expression patterns of myokines or other proteins depending on their fiber-composition [38, 39]. In this sense, in the case of EDL, which is mostly affected by the disease progression with respect to SOL, the protective effect of TTC could not be sufficient enough to modulate caspase-1 levels.

Given the evident activation of the NLRP3 inflammasome in ALS, therapies targeting that activation have been developed in an attempt to palliate the inflammatory processes. In ALS microglial cells, NLRP3 inflammasome activation was inhibited through the anti-inflammatory cyclic dipeptide (His-Pro) [40]. Similarly, the anti-inflammatory molecule 17 β -estradiol improved the motoneurons survival in SOD1G93A and reduced the NLRP3 inflammasome in the spinal cord of these mice, especially caspase-1 and IL-1 β , suggesting the potential beneficial effect of modulating NLRP3 inflammasome in ALS [41]. In line with these findings, we observed that TTC could reduce the levels of NLRP3 and caspase-1 in spinal cord and SOL. However, this downregulation was not found in EDL, and it did not imply the following decrease of the other components of the inflammasome, especially IL-1 β , which is the final effector of this complex and finally leads to neuroinflammation. Despite the influence of TTC on the expression of some of these proteins, further research is needed to elucidate to how extent these changes could lead to an alleviation of the mechanisms involving NLRP3 inflammasome in the disease.

In conclusion, our results suggest that TTC could have a potential anti-inflammatory effect by reducing IL-6 levels in tissues drastically affected by the disease, and also modulating the expression of NLRP3 inflammasome proteins. Although further research is needed to study more in depth the anti-inflammatory effect of TTC in ALS, this characteristic added to the other properties of TTC previously observed in the SOD1G93A mice may point out TTC as a potential therapeutic molecule for ALS.

List of abbreviations

ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
ACTB	Beta actin
BSA	Bovine serum albumin
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
EDL	Extensor digitorum longus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IL	Interleukin
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 alpha
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
PBS	Phosphate-buffered saline
sALS	Sporadic amyotrophic lateral sclerosis
SOL	Soleus
TTC	C-terminal fragment of the tetanus toxin
TG	Transgenic
WT	Wildtype

Author's Contributions

AC, PZ and RO were implied in the experimental design. JA produced and provided the TTC protein. LM-M, MM and MT performed the experimental work. AC, LM-M and RO interpreted the data and performed the statistical analysis. AC and LM-M were major contributors in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research was funded by Instituto de Salud Carlos III (Grant PI17/00949) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” from the European Union, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-612), Fundación FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras), and Consolidated Groups from

Gobierno de Aragón. LM-M is supported by Departamento de Industria e Innovación from Gobierno de Aragón and Fondo Social Europeo.

Acknowledgments

We acknowledge Instituto de Salud Carlos III, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” from the European Union, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Fundación FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras), Consolidated Groups from Gobierno de Aragón, and Fondo Social Europeo for their funding.

References

1. Scott, A. Drug therapy: On the treatment trail for ALS. *Nature* 2017, 550, S120-S121, 10.1038/550S120a [doi].
2. Ransohoff, R.M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 2016, 353, 777-783, 10.1126/science.aag2590 [doi].
3. Thonhoff, J.R.; Simpson, E.P.; Appel, S.H. Neuroinflammatory mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Curr. Opin. Neurol.* 2018, 31, 635-639, 10.1097/WCO.0000000000000599 [doi].
4. Liu, J.; Wang, F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front. Immunol.* 2017, 8, 1005, 10.3389/fimmu.2017.01005 [doi].
5. Moreno-Martinez, L.; Calvo, A.C.; Munoz, M.J.; Osta, R. Are Circulating Cytokines Reliable Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis? *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 10.3390/ijms20112759, E2759 [pii].
6. Bellezza, I.; Grottelli, S.; Costanzi, E.; Scarpelli, P.; Pigna, E.; Morozzi, G.; Mezzasoma, L.; Peirce, M.J.; Moresi, V.; Adamo, S.; Minelli, A. Peroxynitrite Activates the NLRP3 Inflammasome Cascade in SOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 2018, 55, 2350-2361, 10.1007/s12035-017-0502-x [doi].

7. Gugliandolo, A.; Giacompo, S.; Bramanti, P.; Mazzon, E. NLRP3 Inflammasome Activation in a Transgenic Amyotrophic Lateral Sclerosis Model. *Inflammation* 2018, 41, 93-103, 10.1007/s10753-017-0667-5 [doi].
8. Debye, B.; Schmulling, L.; Zhou, L.; Rune, G.; Beyer, C.; Johann, S. Neurodegeneration and NLRP3 inflammasome expression in the anterior thalamus of SOD1(G93A) ALS mice. *Brain Pathol.* 2018, 28, 14-27, 10.1111/bpa.12467 [doi].
9. He, Y.; Hara, H.; Nunez, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem. Sci.* 2016, 41, 1012-1021, S0968-0004(16)30148-7 [pii].
10. Michaelson, N.; Facciponte, D.; Bradley, W.; Stommel, E. Cytokine expression levels in ALS: A potential link between inflammation and BMAA-triggered protein misfolding. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017, 37, 81-88, S1359-6101(17)30060-6 [pii].
11. Kim, S.H.; Oh, K.W.; Jin, H.K.; Bae, J.S. Immune inflammatory modulation as a potential therapeutic strategy of stem cell therapy for ALS and neurodegenerative diseases. *BMB Rep.* 2018, 51, 545-546, 4398 [pii].
12. Thonhoff, J.R.; Beers, D.R.; Zhao, W.; Pleitez, M.; Simpson, E.P.; Berry, J.D.; Cudkowicz, M.E.; Appel, S.H. Expanded autologous regulatory T-lymphocyte infusions in ALS: A phase I, first-in-human study. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm* 2018, 5, e465, 10.1212/NXI.0000000000000465 [doi].
13. Beers, D.R.; Appel, S.H. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *Lancet Neurol.* 2019, 18, 211-220, S1474-4422(18)30394-6 [pii].
14. Toivonen, J.M.; Olivan, S.; Osta, R. Tetanus toxin C-fragment: the courier and the cure? *Toxins (Basel)* 2010, 2, 2622-2644, 10.3390/toxins2112622 [doi].
15. Calvo, A.C.; Moreno-Igoa, M.; Mancuso, R.; Manzano, R.; Olivan, S.; Munoz, M.J.; Penas, C.; Zaragoza, P.; Navarro, X.; Osta, R. Lack of a synergistic effect of a non-viral ALS gene therapy based on BDNF and a TTC fusion molecule. *Orphanet J. Rare Dis.* 2011, 6, 10-1172-6-10, 10.1186/1750-1172-6-10 [doi].
16. Moreno-Igoa, M.; Calvo, A.C.; Penas, C.; Manzano, R.; Olivan, S.; Munoz, M.J.; Mancuso, R.; Zaragoza, P.; Aguilera, J.; Navarro, X.; Osta Pinzolas, R. Fragment C of tetanus toxin, more than a

carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *J. Mol. Med. (Berl)* 2010, 88, 297-308, 10.1007/s00109-009-0556-y [doi].

17. Ehrhart, J.; Smith, A.J.; Kuzmin-Nichols, N.; Zesiewicz, T.A.; Jahan, I.; Shytle, R.D.; Kim, S.H.; Sanberg, C.D.; Vu, T.H.; Gooch, C.L.; Sanberg, P.R.; Garbuzova-Davis, S. Humoral factors in ALS patients during disease progression. *J. Neuroinflammation* 2015, 12, 127-015-0350-4, 10.1186/s12974-015-0350-4 [doi].

18. Ngo, S.T.; Steyn, F.J.; Huang, L.; Mantovani, S.; Pfluger, C.M.; Woodruff, T.M.; O'Sullivan, J.D.; Henderson, R.D.; McCombe, P.A. Altered expression of metabolic proteins and adipokines in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2015, 357, 22-27, 10.1016/j.jns.2015.06.053 [doi].

19. Lu, C.H.; Allen, K.; Oei, F.; Leoni, E.; Kuhle, J.; Tree, T.; Fratta, P.; Sharma, N.; Sidle, K.; Howard, R.; Orrell, R.; Fish, M.; Greensmith, L.; Pearce, N.; Gallo, V.; Malaspina, A. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm* 2016, 3, e244, 10.1212/NXI.0000000000000244 [doi].

20. Blasco, H.; Garcon, G.; Patin, F.; Veyrat-Durebex, C.; Boyer, J.; Devos, D.; Vourc'h, P.; Andres, C.R.; Corcia, P. Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. *Can. J. Neurol. Sci.* 2017, 44, 90-95, 10.1017/cjn.2016.284 [doi].

21. Hu, Y.; Cao, C.; Qin, X.Y.; Yu, Y.; Yuan, J.; Zhao, Y.; Cheng, Y. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. *Sci. Rep.* 2017, 7, 9094-017-09097-1, 10.1038/s41598-017-09097-1 [doi].

22. Prado, L.G.R.; Rocha, N.P.; de Souza, L.C.; Bicalho, I.C.S.; Gomez, R.S.; Vidigal-Lopes, M.; Braz, N.F.T.; Vieira, E.L.M.; Teixeira, A.L. Longitudinal assessment of clinical and inflammatory markers in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2018, 394, 69-74, S0022-510X(18)30354-X [pii].

23. Chen, Y.; Xia, K.; Chen, L.; Fan, D. Increased Interleukin-6 Levels in the Astrocyte-Derived Exosomes of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Front. Neurosci.* 2019, 13, 574, 10.3389/fnins.2019.00574 [doi].

24. Moreau, C.; Devos, D.; Brunaud-Danel, V.; Defebvre, L.; Perez, T.; Destee, A.; Tonnel, A.B.; Lassalle, P.; Just, N. Elevated IL-6 and TNF-alpha levels in patients with ALS: inflammation or hypoxia? *Neurology* 2005, 65, 1958-1960, 65/12/1958 [pii].

25. Pronto-Laborinho, A.; Pinto, S.; Gromicho, M.; Pereira, M.; Swash, M.; de Carvalho, M. Interleukin-6 and amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2019, 398, 50-53, S0022-510X(19)30026-7 [pii].
26. Qin, X.Y.; Zhang, S.P.; Cao, C.; Loh, Y.P.; Cheng, Y. Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2016, 73, 1316-1324, 10.1001/jamaneurol.2016.2742 [doi].
27. Lai, K.S.P.; Liu, C.S.; Rau, A.; Lanctot, K.L.; Kohler, C.A.; Pakosh, M.; Carvalho, A.F.; Herrmann, N. Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2017, jnnp-2017-316201 [pii].
28. Moreno-Martinez, L.; de la Torre, M.; Toivonen, J.M.; Zaragoza, P.; Garcia-Redondo, A.; Calvo, A.C.; Osta, R. Circulating Cytokines Could Not Be Good Prognostic Biomarkers in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Immunol.* 2019, 10, 801, 10.3389/fimmu.2019.00801 [doi].
29. Sironi, F.; Vallarola, A.; Violatto, M.B.; Talamini, L.; Freschi, M.; De Gioia, R.; Capelli, C.; Agostini, A.; Moscatelli, D.; Tortarolo, M.; Bigini, P.; Introna, M.; Bendotti, C. Multiple intracerebroventricular injections of human umbilical cord mesenchymal stem cells delay motor neurons loss but not disease progression of SOD1G93A mice. *Stem Cell. Res.* 2017, 25, 166-178, S1873-5061(17)30235-0 [pii].
30. Korhonen, P.; Pollari, E.; Kanninen, K.M.; Savchenko, E.; Lehtonen, S.; Wojciechowski, S.; Pomeschchik, Y.; Van Den Bosch, L.; Goldsteins, G.; Koistinaho, J.; Malm, T. Long-term interleukin-33 treatment delays disease onset and alleviates astrocytic activation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *IBRO Rep.* 2019, 6, 74-86, 10.1016/j.ibror.2019.01.005 [doi].
31. Lu, J.; Zheng, Y.; Yang, J.; Zhang, J.; Cao, W.; Chen, X.; Fang, S. Resveratrol alleviates inflammatory injury and enhances the apoptosis of fibroblastlike synoviocytes via mitochondrial dysfunction and ER stress in rats with adjuvant arthritis. *Mol. Med. Rep.* 2019, 20, 463-472, 10.3892/mmr.2019.10273 [doi].
32. Kuhle, J.; Lindberg, R.L.; Regeniter, A.; Mehling, M.; Steck, A.J.; Kappos, L.; Czaplinski, A. Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 2009, 16, 771-774, 10.1111/j.1468-1331.2009.02560.x [doi].

33. Yang, X.; Gao, L.; Wu, X.; Zhang, Y.; Zang, D. Increased levels of MIP-1alpha in CSF and serum of ALS. *Acta Neurol. Scand.* 2016, 134, 94-100, 10.1111/ane.12513 [doi].
34. Guo, J.; Yang, X.; Gao, L.; Zang, D. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS. *Brain Behav.* 2017, 7, e00637, 10.1002/brb3.637 [doi].
35. Meissner, F.; Molawi, K.; Zychlinsky, A. Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1beta accelerates ALS pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010, 107, 13046-13050, 10.1073/pnas.1002396107 [doi].
36. Johann, S.; Heitzer, M.; Kanagaratnam, M.; Goswami, A.; Rizo, T.; Weis, J.; Troost, D.; Beyer, C. NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *Glia* 2015, 63, 2260-2273, 10.1002/glia.22891 [doi].
37. Lehmann, S.; Esch, E.; Hartmann, P.; Goswami, A.; Nikolin, S.; Weis, J.; Beyer, C.; Johann, S. Expression profile of pattern recognition receptors in skeletal muscle of SOD1((G93A)) amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice and sporadic ALS patients. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2018, 44, 606-627, 10.1111/nan.12483 [doi].
38. Okumura, N.; Hashida-Okumura, A.; Kita, K.; Matsubae, M.; Matsubara, T.; Takao, T.; Nagai, K. Proteomic analysis of slow- and fast-twitch skeletal muscles. *Proteomics* 2005, 5, 2896-2906, 10.1002/pmic.200401181 [doi].
39. Jia, W.H.; Wang, N.Q.; Yin, L.; Chen, X.; Hou, B.Y.; Qiang, G.F.; Chan, C.B.; Yang, X.Y.; Du, G.H. Effect of skeletal muscle phenotype and gender on fasting-induced myokine expression in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019, 514, 407-414, S0006-291X(19)30806-X [pii].
40. Grottelli, S.; Mezzasoma, L.; Scarpelli, P.; Cacciatore, I.; Cellini, B.; Bellezza, I. Cyclo(His-Pro) inhibits NLRP3 inflammasome cascade in ALS microglial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 2019, 94, 23-31, S1044-7431(18)30241-0 [pii].
41. Heitzer, M.; Kaiser, S.; Kanagaratnam, M.; Zendedel, A.; Hartmann, P.; Beyer, C.; Johann, S. Administration of 17beta-Estradiol Improves Motoneuron Survival and Down-regulates Inflammasome Activation in Male SOD1(G93A) ALS Mice. *Mol. Neurobiol.* 2017, 54, 8429-8443, 10.1007/s12035-016-0322-4 [doi].

Figures and tables

Table 1. Levels of pro-inflammatory mediators in serial plasma samples from control and TTC-treated SOD1G93A transgenic mice at P60, P90 and P110. The sample size was 11 (5 Control and 6 TTC) mice for eotaxin-1, IL-2, IL-6 and MIP-1 α , and 22 (11 control and 11 TTC) mice for galectin-1. Unrelated t-test or Mann-Whitney U-tests were used. Values are mean \pm standard error of the mean. *p<0.05.

Protein	Age	Control	TTC	p-value
Eotaxin-1 (pg/ml)	P60	163.407 \pm 15.992	170.119 \pm 19.104	0,799
	P90	158.566 \pm 17.151	147.400 \pm 19.803	0,687
	P110	236.529 \pm 19.625	203.274 \pm 33.074	0,412
Galectin-1 (pg/ml)	P60	42562.638 \pm 6977.809	42872.392 \pm 4757.342	0,971
	P90	21041.705 \pm 1657.878	25930.396 \pm 3328.63	0,192
	P110	37897.955 \pm 4724.214	39839.61 \pm 5479.457	0,798
IL-2 (pg/ml)	P60	2.262 \pm 0.442	2.420 \pm 0.403	0,816
	P90	1.994 \pm 0.697	1.870 \pm 0.667	0,902
	P110	2.980 \pm 1.077	3.376 \pm 1.654	0,853
IL-6 (pg/ml)	P60	13.451 \pm 3.255	5.626 \pm 1.064	0,062
	P90	13.810 \pm 0.502	7.735 \pm 1.764	*0,021
	P110	13.097 \pm 1.828	10.727 \pm 2.188	0,429
MIP-1α (pg/ml)	P60	0.820 \pm 0.144	0.552 \pm 0.093	0,157
	P90	0.659 \pm 0.137	0.706 \pm 0.281	0,877
	P110	1.250 \pm 0.267	1.278 \pm 0.256	0,941

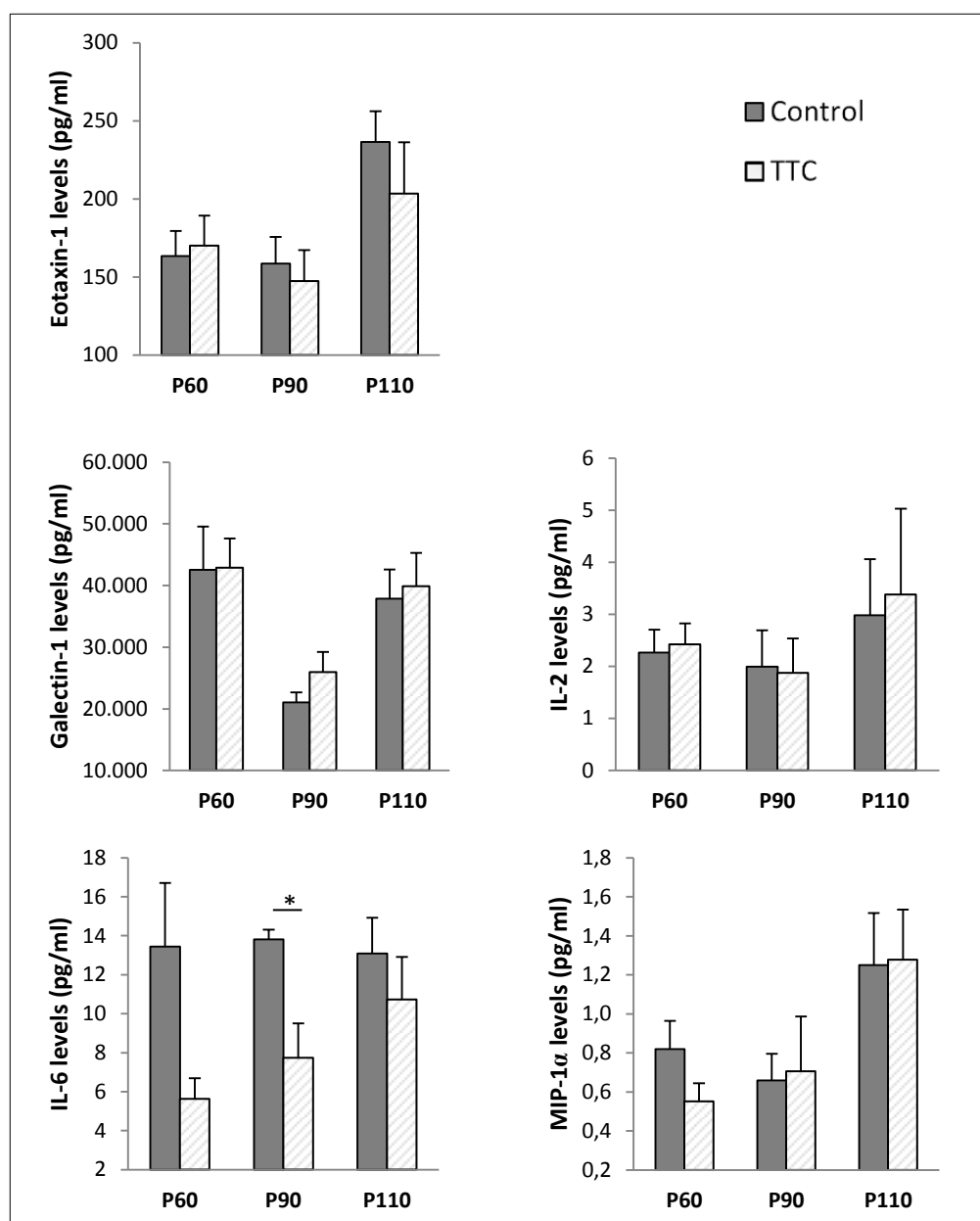


Figure 1. Expression of pro-inflammatory mediators in serial plasma samples from control and TTC-treated SOD1G93A transgenic mice at P60, P90 and P110. The sample size was 11 (5 Control and 6 TTC) mice for eotaxin-1, IL-2, IL-6 and MIP-1 α , and 22 (11 control and 11 TTC) mice for galectin-1. Unrelated t-test or Mann-Whitney U-tests were used. Graphics shows mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$.

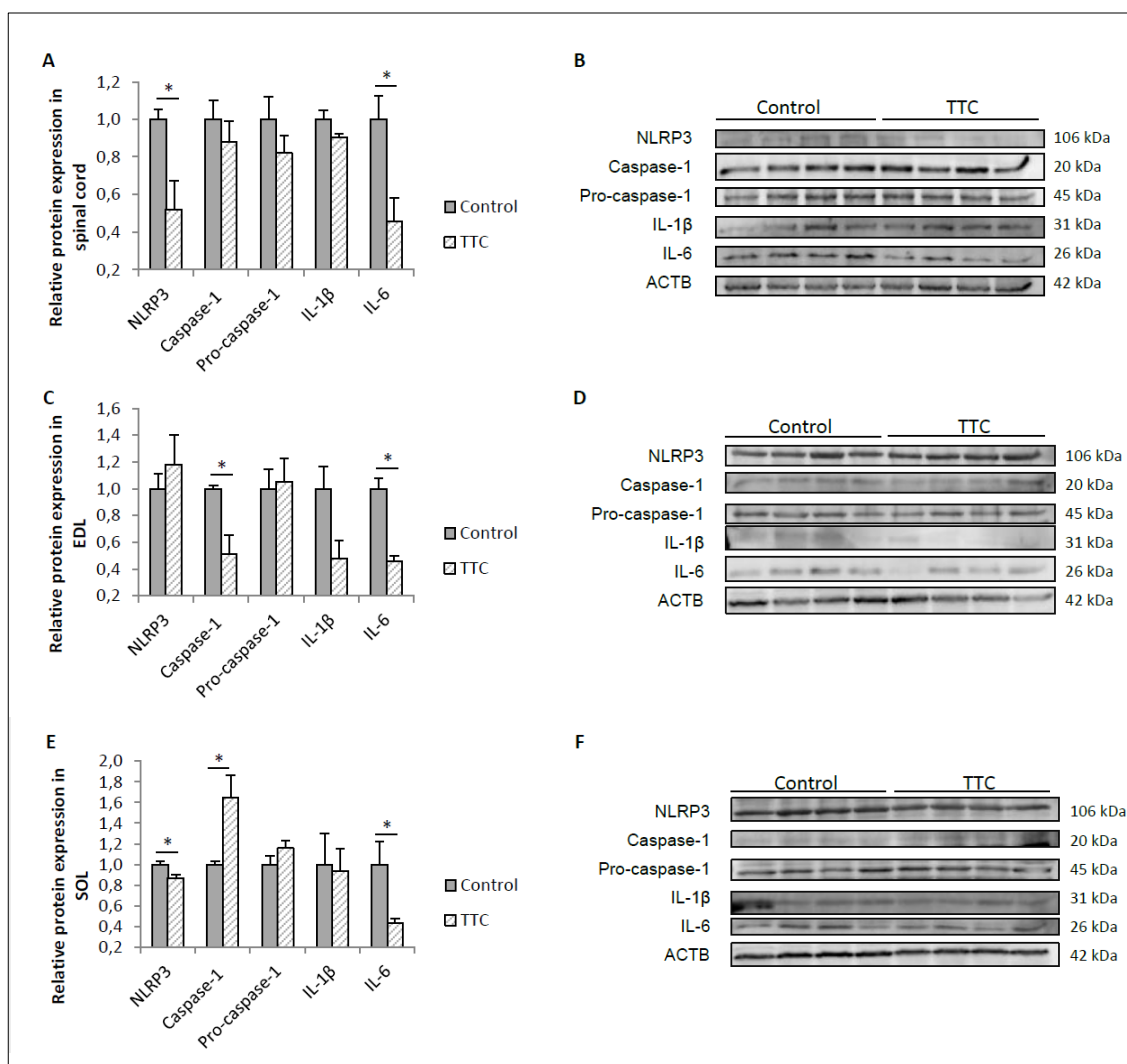


Figure 2. Relative protein expression of NLRP3, caspase-1, pro-caspase-1, IL-1 β and IL-6 in spinal cord, EDL and SOL from control and TTC-treated SOD1G93A transgenic mice at P110. Protein expression of NLRP3, caspase-1, pro-caspase-1, IL-1 β and IL-6 was analyzed in spinal cord (A, B), EDL (C, D) and SOL (E, F). The sample size was 4 control and 4 TTC-treated mice. Unrelated t-test or Mann-Whitney U-tests were used. Graphics shows relative mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$.



Partial genetic deficiency of granzyme A prolongs survival in an ALS mouse model.

Moreno-Martínez, L.; Santiago, L.; de la Torre M., Calvo, A.C.; Pardo, J.; Osta R.

Enviado a *Journal of Neuroinflammation*.

Abstract

The immune system is dysregulated in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), contributing to exacerbate the course of the disease. Granzyme A (gzmA) is a serine protease involved in the modulation of the inflammatory immune response that has been found elevated in serum from ALS patients. However, it is not clear yet whether gzmA could influence on progression of ALS disease. Thus, the aim of our work was to assess whether the absence of gzmA in an ALS murine model could help to slow down the progression of the disease. Homozygous and hemizygous gzmA deficient mice expressing the SOD1G93A transgene were generated by crossing the SOD1G93A transgenic and gzmA deficient mice. Survival of mice presenting the three gzmA genotypes was monitored and Gzma gene expression was measured in spinal cord and quadriceps from these mice. We observed the greatest lifespan in gzmA^{+/-} mice, which was similar to the one observed in gzmA^{-/-} mice, whereas gzmA^{+/+} showed the shortest survival rate. Gzma gene expression was downregulated in spinal cord from gmzA^{+/-} mice, confirming that increased survival of hemizygous mice correlated with lower gzmA gene expression levels. In addition, mRNA levels of IL-1 β , a pro-inflammatory cytokine, and GSR, involved in oxidative stress, were also found downregulated in spinal cord from gmzA^{+/-} mice. In summary, our findings indicate for the first time that reduced levels, but not the absence, of gzmA could ameliorate the disease progression in this animal model.

Keywords: granzyme A; SOD1G93A mice; inflammation; amyotrophic lateral sclerosis; genetic background.

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease that leads to progressive motor neuron degeneration and muscle denervation [1]. Only 5-10% of ALS patients have a family history, whereas more than 90% of ALS cases are sporadic with unknown cause. One of the emerging mechanisms involved in ALS pathogenesis is neuroinflammation [2-4]. Supporting this, many pro-inflammatory molecules have been found upregulated in both SOD1G93A mice and ALS patients, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6 [5, 6], becoming possible therapeutic targets.

Granule-secreted enzymes (granzymes) belong to the family of serine proteases which are mainly, but not exclusively, expressed by T lymphocytes and natural killer (NK) cells [7, 8]. Traditionally they were thought to exert their biological functions by inducing cell death in tumor and virus infected cells; however, in the last years it has become clear that they can also regulate other biological processes including the modulation of the inflammatory immune response during different inflammatory/autoimmune diseases like sepsis, aging, cardiovascular diseases or arthritis [7-9].

In relation to ALS, there is only one study reporting that both granzyme A (gzmA) and granzyme B (gzmB) serum levels were elevated in ALS patients and associated with faster progression of the disease [10]. Moreover, it has been demonstrated that gzmA can induce a pro-inflammatory cytokine response in different cell types [11], suggesting that granzymes could also be harmful in ALS. Considering this, we hypothesized that the absence of gzmA could help to slow down the course of ALS in vivo.

Material and Methods

Animals

B6SJL-Tg SOD1G93A mice (stock number 002726, The Jackson Laboratory), inbred C57BL/6 mouse deficient in granzyme A (provided by Markus Simon from the Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) and their offspring were housed at the animal facilities in the Centro de Investigación Biomédica de Aragón. Their genotypes were analyzed as previously described [12] and following the The Jackson Laboratory protocol.

All procedures were approved by the Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza (PI29/13). The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Crossing and survival studies

Firstly, littermate hemizygous SOD1G93A mice (*gzmA*^{+/-} and *gzmA*^{-/-}) were obtained by crossing hemizygous SOD1G93A and *gzmA* males with C57BL/6 females deficient in *gzmA*. Survival analysis included the littermate sex-balanced hemizygous SOD1G93A mice (n=16 *gzmA*^{-/-}; n=13 *gzmA*^{+/-}), and also a group of B6SJL-Tg SOD1G93A mice (n=57 SOD1^{+/-}, *gzmA*^{+/+}).

Secondly, we crossed hemizygous SOD1G93A and hemizygous *gzmA* mice to generate littermate mice with the three *gzmA* genotypes in the same genetic background. Second survival analysis involved littermate sex-balanced hemizygous SOD1G93A mice (n=34 *gzmA*^{-/-}, n=49 *gzmA*^{+/-} and n=19 *gzmA*^{+/+}).

The humane endpoint for these mice was defined as the loss of righting reflex as shown by a failure to right after laying the mouse on its side for 30 seconds [13], used in survival studies.

RTqPCR

Quadriceps and spinal cords were obtained from 16 littermate SOD1G93A mice (6 *gzmA*^{+/+}, 6 *gzmA*^{+/-}, and 4 *gzmA*^{-/-}) at the endpoint. RNA and cDNA were extracted using the kits Direct-zol™ RNA MiniPrep (R2052, Zymo Research Corp.) and qScript™ cDNA SuperMix (Quanta BioScience, Inc.), respectively. Following this, the gene expression of *gzmA* (*Gzma*), IL-1β (*Il1b*), IL-6 (*Il6*), glutathione reductase (*Gsr*) and metallothionein 2 (*Mt2*) was quantified by qPCR using TaqMan® probes (Mm01304452_m1, Mm00434228_m1, Mm00446190_m1, Mm00833903_m1, Mm00809556_s1, Applied Biosystems Inc., respectively). The data obtained were normalized with the housekeeping glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) (4352932E, Applied Biosystems Inc.) mixed with TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.). The $\Delta\Delta\text{CT}$ method was used to determine relative changes in transcriptional expression. Statistical analyses of the data were performed using the fold change ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$), as previously described [14].

Statistical analysis

The survival time of mice was evaluated using Kaplan-Meier analysis and Log-Rank test. Comparisons of means of gene expression were analyzed by unrelated t-test. Statistical analysis

was performed using SPSS (version 20, IBM, Armonk, NY) and GraphPad Prism Software (version 5, La Jolla, CA). Significance levels were set at a p-value less than 0.05.

Results

Lifespan is shorter in gzmA+/+ mice.

Our aim was to assess whether deficiency of gzmA could influence survival rate of SOD1G93A transgenic mice. Firstly, we analyzed the lifespan of three groups of mice expressing the SOD1G93A transgene but different alleles of gzmA: gzmA+/- and gzmA-/- generated by crossing gzmA-/- mice with SOD1G93A transgenic mice and expressing the same genetic background; and gzmA+/+ (SOD1G93A transgenic mice) with different background. The survival rate mean (days) and the standard error of the mean (SEM) for each group was: gzmA+/+ (130.44 ± 1.13), gzmA+/- (141.38 ± 2.14) and gzmA-/- (145.81 ± 2.24). After the statistical analysis, we observed that both gzmA+/- and gzmA-/- mice lived significantly longer (p<0.001) than gzmA+/+ mice (Figure 1A). However, this difference could be as a result from either the action of gzmA or the different genetic background of mice.

To elucidate whether or not the background could influence the survival time, we carried out a second mate to obtain littermate transgenic mice presenting the three gzmA genotypes in the same genetic background. The mean survival rate (days) and SEM for each group was: gzmA+/+ (143.00 ± 2.34), gzmA+/- (149.12 ± 1.34) and gzmA-/- (147.24 ± 1.33). In this case, similar to the first analysis, gzmA+/+ mice lived shorter than the other two groups, but only mean expression levels of gzmA+/+ and gzmA+/- mice were statistically different (p=0.022). In contrast, no significant differences were found between survival means of neither gzmA-/- mice and gzmA+/+ (p=0.285) nor gzmA-/- and gzmA+/- (p=0.128) (Figure 1B).

Gzma and Il1β gene expression is downregulated in spinal cord from hemizygous gzmA mice.

Considering the different survival time of mice depending on the gzmA genotype, we aimed to confirm that those variations were due to a real downregulation of Gzma gene expression and other gzmA-regulated genes involved in inflammation in affected tissues from these animals. In this sense, we analyzed spinal cord and quadriceps muscle, which are the main damaged tissues in ALS. The qPCR assay showed that both Gzma and Il1β mRNA levels were statistically significant lower in spinal cord from gzmA+/- mice compared to the levels obtained from

gzmA^{+/+} mice ($p < 0.05$). As expected, no Gzma expression was detected in the gzmA knock-out mice used as controls (Figure 2).

Oxidative stressed is reduced in spinal cord from hemizygous gzmA mice.

To study more in depth the effect of the reduction of gzmA we measured mRNA levels of Gsr and Mt2, involved in oxidative stress, which is a relevant mechanism dysregulated in ALS disease. We found a significant downregulation of Gsr mRNA levels in spinal cord from hemizygous mice compared to the levels obtained in homozygous mice ($p < 0.05$) (Figure 2).

Discussion

Neuroinflammation is one of the hallmarks in ALS, where an inflammatory status prevails as disease progresses. Among the very well-known granzymes in humans, gzmA mainly potentiates the release of cytokines to the extracellular environment, promoting a pro-inflammatory response [15] and participating in inflammatory and autoimmune diseases [16-18]. In this line, a gzmA knockout mouse showed reduced levels of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis and sepsis mouse models [19, 20]. Considering this, the fine-tune modulation of gzmA response could be also altered to counteract inflammation in ALS, since a previous clinical study in patients suggested a link between ALS and gzmA [10]. In this work we found that reduced levels, but not the total absence, of granzyme A slowed down the course of the disease.

In the first cross we observed that gzmA^{+/-} and gzmA^{-/-} mice survived more than ten days longer than gzmA^{+/+} mice suggesting that a downregulation of gzmA could ameliorate the course of the disease. However, the genetic background might influence the lifespan duration in the animals, as previously reported in this mouse model [21, 22].

In the second mate we also observed differences between the lifespan duration of homozygous and hemizygous mice in the same genetic background. However, only hemizygous mice showed the greatest survival rate, possibly because gzmA could play a dual role in inflammation, and be partially beneficial for the disease.

To support our results, lower Gzma mRNA levels were found in spinal cord from hemizygous mice compared to gzmA^{+/+} mice, which is in accordance with the observed differences in the lifespan of mice. In addition, we also found the gene expression of Il1 β , a pro-inflammatory cytokine related to GzmA, was downregulated in spinal cord from hemizygous mice. Similarly,

other studies have focused on pro-inflammatory molecules involved in ALS pathology that are indirectly related to *gzmA*. Some studies have shown associations between the absence of several molecules and faster or slower disease progression [23-25]. For instance, the deficiency of IL-1 β extended the lifespan in SOD1G93A transgenic mice [26], which could explain the longer survival rate observed in *gzmA*^{+/-} mice since *gzmA* can directly or indirectly activate the production of IL-1 β [11, 15]. Similarly to our results, another work suggested there was no link between the lack of IL-6 and the disease progression or the lifespan in SOD1/IL6 transgenic mice [27].

On the other hand, we found *Gsr* mRNA levels reduced in spinal cord from hemizygous *gzmA* mice. It has been shown that oxidative stress is enhanced in transgenic SOD1G93A mice at terminal stages, triggering progressive mitochondrial damage during disease course. Concerning the protective effect of reduced *gzmA* levels and accordingly to our results, this mitochondrial damage in transgenic *gzmA*^{+/+} mice could be favored in a greater extent than in transgenic *gzmA*^{+/-} mice since *gzmA* has been shown to activate reactive oxygen species (ROS) generation from mitochondria [28, 29]. In contrast, the total absence of *gzmA* does not seem to have a potential effect to counteract the oxidative stress on neither the spinal cord nor quadriceps.

In conclusion, we demonstrated that the absence of *gzmA* did not prolong the survival in SOD1G93A mice, but a partial deficiency of *gzmA* could be enough to ameliorate the progression of the disease, which could be explained by a dual role of *gzmA*-mediated inflammation in ALS. These are only preliminary results and further research is needed to elucidate the role of *gzmA* in ALS pathogenesis.

List of abbreviations

ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
Gsr	Glutathione reductase
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
gzmA	Granzyme A
gzmB	Granzyme B
IL	Interleukin
Mt2	Metallothionein 2
NK	Natural killer
ROS	Reactive oxygen species
SEM	Standard error of the mean
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha

Declarations***Ethics approval and consent to participate***

All procedures were approved by the Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza (PI29/13). The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This research was funded by Instituto de Salud Carlos III (Grant PI17/00949) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” from the European Union, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-612), Fundación FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras), and Consolidated Groups from Gobierno de Aragón. LM-M is supported by Departamento de Industria e Innovación from Gobierno de Aragón and Fondo Social Europeo.

Author’s Contributions

JP and RO were implied in the experimental design. LM-M and MT supervised survival time of mice. JP, LM-M, LS and RO interpreted the data and performed the statistical analysis. ACC and LM-M were major contributors in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Elena Tapia and the workers of the animal house in the Centro de Investigación Biomédica de Aragón for their help in maintaining the mice colony.

References

1. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL, World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000 Dec;1(5):293-9.
2. Phani S, Re DB, Przedborski S. The Role of the Innate Immune System in ALS. *Front Pharmacol*. 2012 Aug 14;3:150.
3. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016 Aug 19;353(6301):777-83.
4. Liu J, Wang F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Immunol*. 2017 Aug 21;8:1005.

5. Jeyachandran A, Mertens B, McKissick EA, Mitchell CS. Type I Vs. Type II Cytokine Levels as a Function of SOD1 G93A Mouse Amyotrophic Lateral Sclerosis Disease Progression. *Front Cell Neurosci.* 2015 Dec 1;9:462.
6. Hu Y, Cao C, Qin XY, Yu Y, Yuan J, Zhao Y, et al. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. *Sci Rep.* 2017 Aug 22;7(1):9094,017-09097-1.
7. Martinez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res.* 2015 Nov 15;21(22):5047-56.
8. Turner CT, Lim D, Granville DJ. Granzyme B in skin inflammation and disease. *Matrix Biol.* 2017 Dec 14.
9. Arias M, Martinez-Lostao L, Santiago L, Ferrandez A, Granville DJ, Pardo J. The Untold Story of Granzymes in Oncoimmunology: Novel Opportunities with Old Acquaintances. *Trends Cancer.* 2017 Jun;3(6):407-22.
10. Ilzecka J. Granzymes A and B levels in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Biochem.* 2011 Jun;44(8-9):650-3.
11. Metkar SS, Menea C, Pardo J, Wang B, Wallich R, Freudenberg M, et al. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. *Immunity.* 2008 Nov 14;29(5):720-33.
12. Simon MM, Hausmann M, Tran T, Ebnet K, Tschopp J, ThaHla R, et al. In vitro- and ex vivo-derived cytolytic leukocytes from granzyme A x B double knockout mice are defective in granule-mediated apoptosis but not lysis of target cells. *J Exp Med.* 1997 Nov 17;186(10):1781-6.
13. Acevedo-Arozena A, Kalmar B, Essa S, Ricketts T, Joyce P, Kent R, et al. A comprehensive assessment of the SOD1G93A low-copy transgenic mouse, which models human amyotrophic lateral sclerosis. *Dis Model Mech.* 2011 Sep;4(5):686-700.
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
15. van Eck JA, Shan L, Meeldijk J, Hack CE, Bovenschen N. A novel proinflammatory role for granzyme A. *Cell Death Dis.* 2017 Feb 23;8(2):e2630.

16. Duvall MG, Barnig C, Cernadas M, Ricklefs I, Krishnamoorthy N, Grossman NL, et al. Natural killer cell-mediated inflammation resolution is disabled in severe asthma. *Sci Immunol*. 2017 Mar 10;2(9):10.1126/sciimmunol.aam5446.
17. Garcia-Laorden MI, Stroo I, Terpstra S, Florquin S, Medema JP, van T Veer C, et al. Expression and Function of Granzymes A and B in *Escherichia coli* Peritonitis and Sepsis. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:4137563.
18. Campbell RA, Franks Z, Bhatnagar A, Rowley JW, Manne BK, Supiano MA, et al. Granzyme A in Human Platelets Regulates the Synthesis of Proinflammatory Cytokines by Monocytes in Aging. *J Immunol*. 2018 Jan 1;200(1):295-304.
19. Arias MA, Jimenez de Bagues MP, Aguilo N, Menao S, Hervas-Stubbs S, de Martino A, et al. Elucidating sources and roles of granzymes A and B during bacterial infection and sepsis. *Cell Rep*. 2014 Jul 24;8(2):420-9.
20. Santiago L, Menea C, Arias M, Martin P, Jaime-Sanchez P, Metkar S, et al. Granzyme A Contributes to Inflammatory Arthritis in Mice Through Stimulation of Osteoclastogenesis. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Feb;69(2):320-34.
21. Mancuso R, Oliván S, Mancera P, Pasten-Zamorano A, Manzano R, Casas C, et al. Effect of genetic background on onset and disease progression in the SOD1-G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2012 May;13(3):302-10.
22. Nardo G, Trolese MC, Tortarolo M, Vallarola A, Freschi M, Pasetto L, et al. New Insights on the Mechanisms of Disease Course Variability in ALS from Mutant SOD1 Mouse Models. *Brain Pathol*. 2016 Mar;26(2):237-47.
23. Van Damme P, Braeken D, Callewaert G, Robberecht W, Van Den Bosch L. GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Jul;64(7):605-12.
24. Lev N, Barhum Y, Lotan I, Steiner I, Offen D. DJ-1 knockout augments disease severity and shortens survival in a mouse model of ALS. *PLoS One*. 2015 Mar 30;10(3):e0117190.
25. Staats KA, Humblet-Baron S, Bento-Abreu A, Scheveneels W, Nikolaou A, Deckers K, et al. Genetic ablation of IP3 receptor 2 increases cytokines and decreases survival of SOD1G93A mice. *Hum Mol Genet*. 2016 Aug 15;25(16):3491-9.

26. Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1 β accelerates ALS pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 20;107(29):13046-50.
27. Han Y, Ripley B, Serada S, Naka T, Fujimoto M. Interleukin-6 Deficiency Does Not Affect Motor Neuron Disease Caused by Superoxide Dismutase 1 Mutation. *PLoS One*. 2016 Apr 12;11(4):e0153399.
28. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Mullbacher A, et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol*. 2004 Nov 8;167(3):457-68.
29. Lieberman J. Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev*. 2010 May;235(1):93-104.

Figures

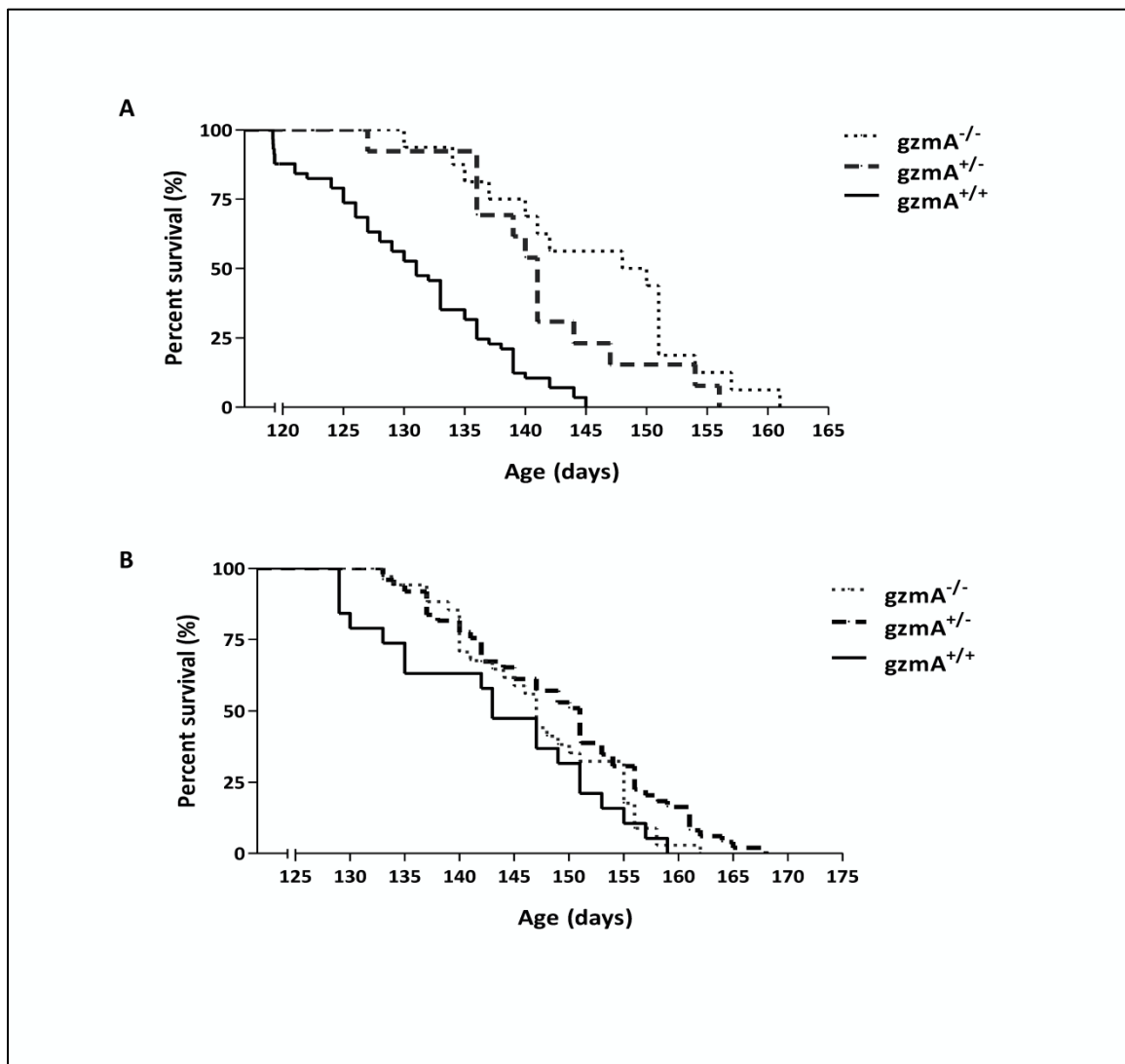


Figure 1. Survival curves of SOD1G93A mice varying in *gzmA* genotype. Survival analyses were performed with mice showing the three *gzmA* genotypes, in different genetic background (A) and the same background (B). In both cases, statistically significant differences were found in the survival rate between *gzmA*^{+/-} and *gzmA*^{+/+} mice ($p < 0.05$). Mean survival rates of *gzmA*^{-/-} mice and *gzmA*^{+/+} mice were statistically different only in the first study ($p < 0.05$) (A).

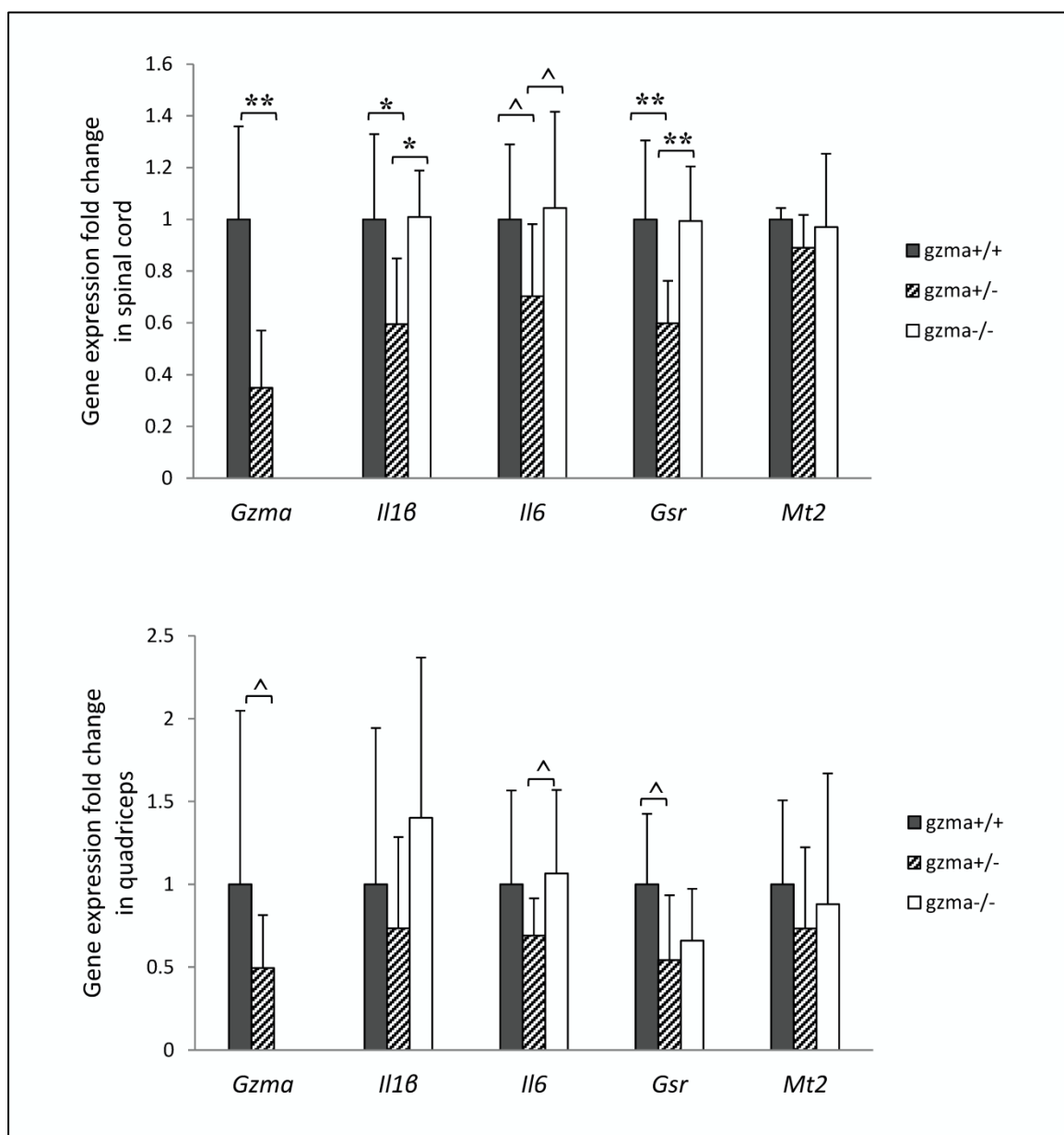


Figure 2. *Gzma*, *Il1β*, *Il6*, *Gsr*, *Mt2* gene expression in spinal cord and quadriceps from SOD1G93A mice. *Gzma*, *Il1β*, *Il6*, *Gsr*, *Mt2* gene expression was analyzed in spinal cord and quadriceps of SOD1^{+/-} mice, including *gzmA+/+*, *gzmA+/-* and *gzmA-/-* genotypes in the same background. *Gzma*, *Il1β* and *Gsr* levels were significantly downregulated in spinal cord from *gzmA+/-* mice compared to the levels found in *gzmA+/+* and/or *gzmA-/-* mice. Bars represent mean ± standard deviation. **p<0.01, *p<0.05, ^p<0.10.

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.- La desregulación de las citoquinas sanguíneas en animales que no presentan sintomatología visible posiciona a estas proteínas como candidatas a ser potenciales biomarcadores de apoyo al diagnóstico en pacientes clínicamente sospechosos de ELA.

2.- La mayor expresión de citoquinas inflamatorias en animales con menor supervivencia apoya la hipótesis de que existen procesos inflamatorios que están acelerando el progreso de la enfermedad, pero los resultados no demuestran que dichas moléculas puedan desempeñar un papel como biomarcadores pronóstico en el modelo animal SOD1G93A debido a su gran variabilidad y no se recomienda su traslación a nivel clínico.

3.- La IL-6 se presenta como un buen biomarcador en tejidos directamente afectados por la enfermedad, especialmente en músculo esquelético con predominio de fibras rápidas en el modelo animal SOD1G93A.

4.- La IL-6 se muestra como una potencial diana terapéutica en la ELA en el modelo animal SOD1G93A dada su modulación bajo el tratamiento con el fragmento C de la toxina tetánica, tratamiento que se ha mostrado eficaz en dicho modelo.

5.- Niveles intermedios de expresión de Granzima A, una serín proteasa capaz de modular la inflamación, favorece una progresión más lenta de la enfermedad en el modelo animal SOD1G93A y respalda el papel dual que se ha descrito de la neuroinflamación en el desarrollo de esta enfermedad.

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.- The deregulation of blood cytokines in animals that do not show visible symptoms points out these proteins as potential biomarkers that can help in the diagnosis in patients clinically suspected of ALS.

2.- The greater expression of inflammatory cytokines in animals with lower survival supports the hypothesis that there are inflammatory processes accelerating the progress of the disease; however, the results do not show that these molecules can play a role as prognostic biomarkers in the animal model SOD1G93A due to its great variability and, thus, its translation at clinical level is not recommended.

3.- IL-6 is presented as a good biomarker in tissues directly affected by the disease, especially in skeletal muscle with a predominance of fast fibers in the animal model SOD1G93A.

4.- IL-6 is shown as a potential therapeutic target in ALS in the animal model SOD1G93A given its modulation under treatment with fragment C of tetanus toxin, a treatment that has been shown effective in that model.

5.- Intermediate levels of expression of Granzyme A, a serin protease able to modulate inflammation, favors a slower progression of the disease in the animal model SOD1G93A and supports the dual role of neuroinflammation that has been described in the development of this disease.

BIBLIOGRAFÍA

7

1. Mora Pardina, J.S. In *Esclerosis Lateral Amiotrófica y otras Enfermedades de la Motoneurona*. Pascual Gómez, J., Ed.; Tratado de Neurología Clínica. Ars Médica.: Barcelona, 2008; pp 797-826.
2. Marin, B.; Boumediene, F.; Logroscino, G.; Couratier, P.; Babron, M.C.; Leutenegger, A.L.; Copetti, M.; Preux, P.M.; Beghi, E. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* **2017**, *46*, 57-74, 10.1093/ije/dyw061 [doi].
3. Logroscino, G.; Piccininni, M. Amyotrophic Lateral Sclerosis Descriptive Epidemiology: The Origin of Geographic Difference. *Neuroepidemiology* **2019**, *52*, 93-103, 10.1159/000493386 [doi].
4. Chio, A.; Logroscino, G.; Traynor, B.J.; Collins, J.; Simeone, J.C.; Goldstein, L.A.; White, L.A. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology* **2013**, *41*, 118-130, 10.1159/000351153 [doi].
5. Brown, R.H., Jr; Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1602, 10.1056/NEJMc1710379 [doi].
6. Arthur, K.C.; Calvo, A.; Price, T.R.; Geiger, J.T.; Chio, A.; Traynor, B.J. Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12408, 10.1038/ncomms12408 [doi].
7. Hardiman, O.; Al-Chalabi, A.; Chio, A.; Corr, E.M.; Logroscino, G.; Robberecht, W.; Shaw, P.J.; Simmons, Z.; van den Berg, L.H. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17071, 10.1038/nrdp.2017.71 [doi].
8. Turner, M.R.; Al-Chalabi, A.; Chio, A.; Hardiman, O.; Kiernan, M.C.; Rohrer, J.D.; Rowe, J.; Seeley, W.; Talbot, K. Genetic screening in sporadic ALS and FTD. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **2017**, *88*, 1042-1044, 10.1136/jnnp-2017-315995 [doi].
9. DeJesus-Hernandez, M.; Mackenzie, I.R.; Boeve, B.F.; Boxer, A.L.; Baker, M.; Rutherford, N.J.; Nicholson, A.M.; Finch, N.A.; Flynn, H.; Adamson, J.; Kouri, N.; Wojtas, A.; Sengdy, P.; Hsiung, G.Y.; Karydas, A.; Seeley, W.W.; Josephs, K.A.; Coppola, G.; Geschwind, D.H.; Wszolek, Z.K.; Feldman, H.; Knopman, D.S.; Petersen, R.C.; Miller, B.L.; Dickson, D.W.; Boylan, K.B.; Graff-Radford, N.R.; Rademakers, R. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* **2011**, *72*, 245-256, 10.1016/j.neuron.2011.09.011 [doi].
10. Turner, M.R.; Hardiman, O.; Benatar, M.; Brooks, B.R.; Chio, A.; de Carvalho, M.; Ince, P.G.; Lin, C.; Miller, R.G.; Mitsumoto, H.; Nicholson, G.; Ravits, J.; Shaw, P.J.; Swash, M.; Talbot, K.; Traynor, B.J.; Van den Berg, L.H.; Veldink, J.H.; Vucic, S.; Kiernan, M.C. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 310-322, 10.1016/S1474-4422(13)70036-X [doi].

11. Volk, A.E.; Weishaupt, J.H.; Andersen, P.M.; Ludolph, A.C.; Kubisch, C. Current knowledge and recent insights into the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Med. Genet.* **2018**, *30*, 252-258, 10.1007/s11825-018-0185-3 [doi].
12. Reaume, A.G.; Elliott, J.L.; Hoffman, E.K.; Kowall, N.W.; Ferrante, R.J.; Siwek, D.F.; Wilcox, H.M.; Flood, D.G.; Beal, M.F.; Brown, R.H., Jr; Scott, R.W.; Snider, W.D. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* **1996**, *13*, 43-47, 10.1038/ng0596-43 [doi].
13. Robberecht, W.; Philips, T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 248-264, 10.1038/nrn3430 [doi].
14. 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. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **1994**, *264*, 1772-1775.
15. Vijayakumar, U.G.; Milla, V.; Cynthia Stafford, M.Y.; Bjourson, A.J.; Duddy, W.; Duguez, S.M. A Systematic Review of Suggested Molecular Strata, Biomarkers and Their Tissue Sources in ALS. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 400, 10.3389/fneur.2019.00400 [doi].
16. Ingre, C.; Roos, P.M.; Piehl, F.; Kamel, F.; Fang, F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Epidemiol.* **2015**, *7*, 181-193, 10.2147/CLEP.S37505 [doi].
17. Zufiria, M.; Gil-Bea, F.J.; Fernandez-Torron, R.; Poza, J.J.; Munoz-Blanco, J.L.; Rojas-Garcia, R.; Riancho, J.; de Munain, A.L. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Prog. Neurobiol.* **2016**, *142*, 104-129, 10.1016/j.pneurobio.2016.05.004 [doi].
18. Nowicka, N.; Juranek, J.; Juranek, J.K.; Wojtkiewicz, J. Risk Factors and Emerging Therapies in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 10.3390/ijms20112616, E2616 [pii].
19. Eisen, A.; Weber, M. The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **2001**, *24*, 564-573, 10.1002/mus.1042 [pii].
20. Kiernan, M.C.; Vucic, S.; Cheah, B.C.; Turner, M.R.; Eisen, A.; Hardiman, O.; Burrell, J.R.; Zoing, M.C. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **2011**, *377*, 942-955, 10.1016/S0140-6736(10)61156-7 [doi].
21. Fischer, L.R.; Culver, D.G.; Tennant, P.; Davis, A.A.; Wang, M.; Castellano-Sanchez, A.; Khan, J.; Polak, M.A.; Glass, J.D. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* **2004**, *185*, 232-240, S0014488603004795 [pii].
22. Martineau, E.; Di Polo, A.; Vande Velde, C.; Robitaille, R. Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS. *Elife* **2018**, *7*, 10.7554/eLife.41973, 10.7554/eLife.41973 [doi].

23. Riancho, J.; Gonzalo, I.; Ruiz-Soto, M.; Berciano, J. Why do motor neurons degenerate? Actualization in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia* **2019**, *34*, 27-37, S0213-4853(16)00002-5 [pii].
24. Taylor, J.P.; Brown, R.H., Jr; Cleveland, D.W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* **2016**, *539*, 197-206, 10.1038/nature20413 [doi].
25. Laslo, P.; Lipski, J.; Nicholson, L.F.; Miles, G.B.; Funk, G.D. GluR2 AMPA receptor subunit expression in motoneurons at low and high risk for degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **2001**, *169*, 461-471, 10.1006/exnr.2001.7653 [doi].
26. Bergemalm, D.; Forsberg, K.; Srivastava, V.; Graffmo, K.S.; Andersen, P.M.; Brannstrom, T.; Wingsle, G.; Marklund, S.L. Superoxide dismutase-1 and other proteins in inclusions from transgenic amyotrophic lateral sclerosis model mice. *J. Neurochem.* **2010**, *114*, 408-418, 10.1111/j.1471-4159.2010.06753.x [doi].
27. Chang, H.Y.; Hou, S.C.; Way, T.D.; Wong, C.H.; Wang, I.F. Heat-shock protein dysregulation is associated with functional and pathological TDP-43 aggregation. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2757, 10.1038/ncomms3757 [doi].
28. 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. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 2720-2728, 10.1093/hmg/ddm226 [doi].
29. Tashiro, Y.; Urushitani, M.; Inoue, H.; Koike, M.; Uchiyama, Y.; Komatsu, M.; Tanaka, K.; Yamazaki, M.; Abe, M.; Misawa, H.; Sakimura, K.; Ito, H.; Takahashi, R. Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 42984-42994, 10.1074/jbc.M112.417600 [doi].
30. Ackerley, S.; Grierson, A.J.; Brownlees, J.; Thornhill, P.; Anderton, B.H.; Leigh, P.N.; Shaw, C.E.; Miller, C.C. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 165-176, 10.1083/jcb.150.1.165 [doi].
31. Miller, K.E.; Sheetz, M.P. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J. Cell. Sci.* **2004**, *117*, 2791-2804, 10.1242/jcs.01130 [doi].
32. Cozzolino, M.; Carri, M.T. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Prog. Neurobiol.* **2012**, *97*, 54-66, 10.1016/j.pneurobio.2011.06.003 [doi].
33. Vande Velde, C.; McDonald, K.K.; Boukhedimi, Y.; McAlonis-Downes, M.; Lobsiger, C.S.; Bel Hadj, S.; Zandona, A.; Julien, J.P.; Shah, S.B.; Cleveland, D.W. Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. *PLoS One* **2011**, *6*, e22031, 10.1371/journal.pone.0022031 [doi].

34. Magrane, J.; Cortez, C.; Gan, W.B.; Manfredi, G. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 1413-1424, 10.1093/hmg/ddt528 [doi].
35. Tan, W.; Pasinelli, P.; Trotti, D. Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 1295-1301, 10.1016/j.bbadis.2014.02.009 [doi].
36. Parone, P.A.; Da Cruz, S.; Han, J.S.; McAlonis-Downes, M.; Vetto, A.P.; Lee, S.K.; Tseng, E.; Cleveland, D.W. 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. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 4657-4671, 10.1523/JNEUROSCI.1119-12.2013 [doi].
37. Laird, F.M.; Farah, M.H.; Ackerley, S.; Hoke, A.; Maragakis, N.; Rothstein, J.D.; Griffin, J.; Price, D.L.; Martin, L.J.; Wong, P.C. Motor neuron disease occurring in a mutant dynactin mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 1997-2005, 10.1523/JNEUROSCI.4231-07.2008 [doi].
38. Bilsland, L.G.; Sahai, E.; Kelly, G.; Golding, M.; Greensmith, L.; Schiavo, G. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 20523-20528, 10.1073/pnas.1006869107 [doi].
39. Cozzolino, M.; Ferri, A.; Valle, C.; Carri, M.T. Mitochondria and ALS: implications from novel genes and pathways. *Mol. Cell. Neurosci.* **2013**, *55*, 44-49, 10.1016/j.mcn.2012.06.001 [doi].
40. Ferraiuolo, L.; Kirby, J.; Grierson, A.J.; Sendtner, M.; Shaw, P.J. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **2011**, *7*, 616-630, 10.1038/nrneurol.2011.152 [doi].
41. 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.; Brustle, O.; Kupper, C.; Klopstock, T.; Otto, M.; Ludolph, A.C.; Arzberger, T.; Kuhn, P.H.; Edbauer, D. TDP-43 loss of function inhibits endosomal trafficking and alters trophic signaling in neurons. *EMBO J.* **2016**, *35*, 2350-2370, embj.201694221 [pii].
42. Farg, M.A.; Sundaramoorthy, V.; Sultana, J.M.; Yang, S.; Atkinson, R.A.; Levina, V.; Halloran, M.A.; Gleeson, P.A.; Blair, I.P.; Soo, K.Y.; King, A.E.; Atkin, J.D. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 3579-3595, 10.1093/hmg/ddu068 [doi].
43. Burk, K.; Pasterkamp, R.J. Disrupted neuronal trafficking in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **2019**, *137*, 859-877, 10.1007/s00401-019-01964-7 [doi].
44. Butti, Z.; Patten, S.A. RNA Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Genet.* **2019**, *9*, 712, 10.3389/fgene.2018.00712 [doi].

45. Zhou, Y.; Liu, S.; Ozturk, A.; Hicks, G.G. FUS-regulated RNA metabolism and DNA damage repair: Implications for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia pathogenesis. *Rare Dis.* **2014**, *2*, e29515, 10.4161/rdis.29515 [doi].
46. 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.; Wang, L.S.; Lee, E.B. Transcriptomic Changes Due to Cytoplasmic TDP-43 Expression Reveal Dysregulation of Histone Transcripts and Nuclear Chromatin. *PLoS One* **2015**, *10*, e0141836, 10.1371/journal.pone.0141836 [doi].
47. Reddy, K.; Zamiri, B.; Stanley, S.Y.; Macgregor, R.B., Jr; Pearson, C.E. The disease-associated r(GGGGCC)_n repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 9860-9866, 10.1074/jbc.C113.452532 [doi].
48. Haeusler, A.R.; Donnelly, C.J.; Periz, G.; Simko, E.A.; Shaw, P.G.; Kim, M.S.; Maragakis, N.J.; Troncoso, J.C.; Pandey, A.; Sattler, R.; Rothstein, J.D.; Wang, J. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* **2014**, *507*, 195-200, 10.1038/nature13124 [doi].
49. Barker, H.V.; Niblock, M.; Lee, Y.B.; Shaw, C.E.; Gallo, J.M. RNA Misprocessing in C9orf72-Linked Neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 195, 10.3389/fncel.2017.00195 [doi].
50. Gao, F.B.; Almeida, S.; Lopez-Gonzalez, R. Dysregulated molecular pathways in amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia spectrum disorder. *EMBO J.* **2017**, *36*, 2931-2950, 10.15252/embj.201797568 [doi].
51. Smith, R.G.; Henry, Y.K.; Mattson, M.P.; Appel, S.H. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **1998**, *44*, 696-699, 10.1002/ana.410440419 [doi].
52. Simpson, E.P.; Henry, Y.K.; Henkel, J.S.; Smith, R.G.; Appel, S.H. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* **2004**, *62*, 1758-1765, 10.1212/wnl.62.10.1758 [doi].
53. 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. Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler.* **2008**, *9*, 177-183, 10.1080/17482960801933942 [doi].
54. Beers, D.R.; Appel, S.H. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 211-220, S1474-4422(18)30394-6 [pii].

55. Hooten, K.G.; Beers, D.R.; Zhao, W.; Appel, S.H. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **2015**, *12*, 364-375, 10.1007/s13311-014-0329-3 [doi].
56. Brooks, B.R.; Miller, R.G.; Swash, M.; Munsat, T.L.; World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler. Other Motor Neuron. Disord.* **2000**, *1*, 293-299.
57. Al-Chalabi, A.; Hardiman, O.; Kiernan, M.C.; Chio, A.; Rix-Brooks, B.; van den Berg, L.H. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *Lancet Neurol.* **2016**, *15*, 1182-1194, 10.1016/S1474-4422(16)30199-5 [doi].
58. Johnsen, B.; Pugdahl, K.; Fuglsang-Frederiksen, A.; Kollwe, K.; Paracka, L.; Dengler, R.; Camdessanche, J.P.; Nix, W.; Liguori, R.; Schofield, I.; Maderna, L.; Czell, D.; Neuwirth, C.; Weber, M.; Drory, V.E.; Abraham, A.; Swash, M.; de Carvalho, M. Diagnostic criteria for amyotrophic lateral sclerosis: A multicentre study of inter-rater variation and sensitivity. *Clin. Neurophysiol.* **2019**, *130*, 307-314, S1388-2457(18)31387-7 [pii].
59. Jaiswal, M.K. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 733-748, 10.1002/med.21528 [doi].
60. Oskarsson, B.; Gendron, T.F.; Staff, N.P. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clin. Proc.* **2018**, *93*, 1617-1628, S0025-6196(18)30266-0 [pii].
61. Goutman, S.A.; Savelieff, M.G.; Sakowski, S.A.; Feldman, E.L. Stem cell treatments for amyotrophic lateral sclerosis: a critical overview of early phase trials. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2019**, *28*, 525-543, 10.1080/13543784.2019.1627324 [doi].
62. Kim, C.; Lee, H.C.; Sung, J.J. Amyotrophic lateral sclerosis - cell based therapy and novel therapeutic development. *Exp. Neurobiol.* **2014**, *23*, 207-214, 10.5607/en.2014.23.3.207 [doi].
63. Lee, H.J.; Kim, K.S.; Ahn, J.; Bae, H.M.; Lim, I.; Kim, S.U. Human motor neurons generated from neural stem cells delay clinical onset and prolong life in ALS mouse model. *PLoS One* **2014**, *9*, e97518, 10.1371/journal.pone.0097518 [doi].
64. Ransohoff, R.M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* **2016**, *353*, 777-783, 10.1126/science.aag2590 [doi].
65. Thonhoff, J.R.; Simpson, E.P.; Appel, S.H. Neuroinflammatory mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Curr. Opin. Neurol.* **2018**, *31*, 635-639, 10.1097/WCO.0000000000000599 [doi].
66. Jara, J.H.; Genc, B.; Stanford, M.J.; Pytel, P.; Roos, R.P.; Weintraub, S.; Mesulam, M.M.; Bigio, E.H.; Miller, R.J.; Ozdinler, P.H. Evidence for an early innate immune response in the

motor cortex of ALS. *J. Neuroinflammation* **2017**, *14*, 129-017-0896-4, 10.1186/s12974-017-0896-4 [doi].

67. Kjaeldgaard, A.L.; Pilely, K.; Olsen, K.S.; Pedersen, S.W.; Lauritsen, A.O.; Moller, K.; Garred, P. Amyotrophic lateral sclerosis: The complement and inflammatory hypothesis. *Mol. Immunol.* **2018**, *102*, 14-25, S0161-5890(18)30196-2 [pii].
68. Liu, J.; Wang, F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1005, 10.3389/fimmu.2017.01005 [doi].
69. Liao, B.; Zhao, W.; Beers, D.R.; Henkel, J.S.; Appel, S.H. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp. Neurol.* **2012**, *237*, 147-152, 10.1016/j.expneurol.2012.06.011 [doi].
70. Appel, S.H.; Zhao, W.; Beers, D.R.; Henkel, J.S. The microglial-motoneuron dialogue in ALS. *Acta Myol* **2011**, *30*, 4-8.
71. Roberts, K.; Zeineddine, R.; Corcoran, L.; Li, W.; Campbell, I.L.; Yerbury, J.J. Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype. *Glia* **2013**, *61*, 409-419, 10.1002/glia.22444 [doi].
72. Zhao, W.; Beers, D.R.; Appel, S.H. Immune-mediated mechanisms in the pathoprosession of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2013**, *8*, 888-899, 10.1007/s11481-013-9489-x [doi].
73. Turner, M.R.; Cagnin, A.; Turkheimer, F.E.; Miller, C.C.; Shaw, C.E.; Brooks, D.J.; Leigh, P.N.; Banati, R.B. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *15*, 601-609, 10.1016/j.nbd.2003.12.012 [doi].
74. Beers, D.R.; Henkel, J.S.; Xiao, Q.; Zhao, W.; Wang, J.; Yen, A.A.; Siklos, L.; McKercher, S.R.; Appel, S.H. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 16021-16026, 0607423103 [pii].
75. Boillee, S.; Yamanaka, K.; Lobsiger, C.S.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Kassiotis, G.; Kollias, G.; Cleveland, D.W. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* **2006**, *312*, 1389-1392, 312/5778/1389 [pii].
76. O'Rourke, J.G.; Bogdanik, L.; Yanez, A.; Lall, D.; Wolf, A.J.; Muhammad, A.K.; Ho, R.; Carmona, S.; Vit, J.P.; Zarrow, J.; Kim, K.J.; Bell, S.; Harms, M.B.; Miller, T.M.; Dangler, C.A.; Underhill, D.M.; Goodridge, H.S.; Lutz, C.M.; Baloh, R.H. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science* **2016**, *351*, 1324-1329, 10.1126/science.aaf1064 [doi].

77. Endo, F.; Komine, O.; Fujimori-Tonou, N.; Katsuno, M.; Jin, S.; Watanabe, S.; Sobue, G.; Dezawa, M.; Wyss-Coray, T.; Yamanaka, K. Astrocyte-derived TGF-beta1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells. *Cell. Rep.* **2015**, *11*, 592-604, 10.1016/j.celrep.2015.03.053 [doi].
78. Lepore, A.C.; Rauck, B.; Dejea, C.; Pardo, A.C.; Rao, M.S.; Rothstein, J.D.; Maragakis, N.J. Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 1294-1301, 10.1038/nn.2210 [doi].
79. Yamanaka, K.; Chun, S.J.; Boillee, S.; Fujimori-Tonou, N.; Yamashita, H.; Gutmann, D.H.; Takahashi, R.; Misawa, H.; Cleveland, D.W. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 251-253, 10.1038/nn2047 [doi].
80. 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.; Kaspar, B.K. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 824-828, 10.1038/nbt.1957 [doi].
81. Wang, L.; Gutmann, D.H.; Roos, R.P. Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 286-293, 10.1093/hmg/ddq463 [doi].
82. Papadeas, S.T.; Kraig, S.E.; O'Banion, C.; Lepore, A.C.; Maragakis, N.J. Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 17803-17808, 10.1073/pnas.1103141108 [doi].
83. Howland, D.S.; Liu, J.; She, Y.; Goad, B.; Maragakis, N.J.; Kim, B.; Erickson, J.; Kulik, J.; DeVito, L.; Psaltis, G.; DeGennaro, L.J.; Cleveland, D.W.; Rothstein, J.D. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 1604-1609, 10.1073/pnas.032539299 [doi].
84. Dunlop, J.; Beal McIlvain, H.; She, Y.; Howland, D.S. Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 1688-1696, 23/5/1688 [pii].
85. Pardo, A.C.; Wong, V.; Benson, L.M.; Dykes, M.; Tanaka, K.; Rothstein, J.D.; Maragakis, N.J. Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1(G93A) mice. *Exp. Neurol.* **2006**, *201*, 120-130, S0014-4886(06)00245-7 [pii].
86. 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. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron* **2014**, *81*, 1001-1008, S0896-6273(14)00016-6 [pii].

87. Fiala, M.; Chattopadhyay, M.; La Cava, A.; Tse, E.; Liu, G.; Lourenco, E.; Eskin, A.; Liu, P.T.; Magpantay, L.; Tse, S.; Mahanian, M.; Weitzman, R.; Tong, J.; Nguyen, C.; Cho, T.; Koo, P.; Sayre, J.; Martinez-Maza, O.; Rosenthal, M.J.; Wiedau-Pazos, M. IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. *J. Neuroinflammation* **2010**, *7*, 76-2094-7-76, 10.1186/1742-2094-7-76 [doi].
88. Rentzos, M.; Rombos, A.; Nikolaou, C.; Zoga, M.; Zouvelou, V.; Dimitrakopoulos, A.; Alexakis, T.; Tsoutsou, A.; Samakovli, A.; Michalopoulou, M.; Evdokimidis, J. Interleukin-17 and interleukin-23 are elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with ALS: a reflection of Th17 cells activation? *Acta Neurol. Scand.* **2010**, *122*, 425-429, 10.1111/j.1600-0404.2010.01333.x [doi].
89. Saresella, M.; Piancone, F.; Tortorella, P.; Marventano, I.; Gatti, A.; Caputo, D.; Lunetta, C.; Corbo, M.; Rovaris, M.; Clerici, M. T helper-17 activation dominates the immunologic milieu of both amyotrophic lateral sclerosis and progressive multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* **2013**, *148*, 79-88, 10.1016/j.clim.2013.04.010 [doi].
90. Beers, D.R.; Henkel, J.S.; Zhao, W.; Wang, J.; Huang, A.; Wen, S.; Liao, B.; Appel, S.H. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **2011**, *134*, 1293-1314, 10.1093/brain/awr074 [doi].
91. 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. Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 64-79, 10.1002/emmm.201201544 [doi].
92. Mantovani, S.; Garbelli, S.; Pasini, A.; Alimonti, D.; Perotti, C.; Melazzini, M.; Bendotti, C.; Mora, G. Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process. *J. Neuroimmunol.* **2009**, *210*, 73-79, 10.1016/j.jneuroim.2009.02.012 [doi].
93. Ohnishi, S.; Ito, H.; Suzuki, Y.; Adachi, Y.; Wate, R.; Zhang, J.; Nakano, S.; Kusaka, H.; Ikehara, S. Intra-bone marrow-bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal model mouse for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* **2009**, *1296*, 216-224, 10.1016/j.brainres.2009.08.012 [doi].
94. 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. Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 3063-3087, 10.1172/JCI62636 [doi].

95. Zondler, L.; Muller, K.; Khalaji, S.; Bliederauser, 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.; Ludolph, A.C.; Danzer, K.M.; Weishaupt, J.H. Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. *Acta Neuropathol.* **2016**, *132*, 391-411, 10.1007/s00401-016-1548-y [doi].
96. Solomon, J.N.; Lewis, C.A.; Ajami, B.; Corbel, S.Y.; Rossi, F.M.; Krieger, C. Origin and distribution of bone marrow-derived cells in the central nervous system in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* **2006**, *53*, 744-753, 10.1002/glia.20331 [doi].
97. Ajami, B.; Bennett, J.L.; Krieger, C.; Tetzlaff, W.; Rossi, F.M. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1538-1543, nn2014 [pii].
98. Gowing, G.; Philips, T.; Van Wijmeersch, B.; Audet, J.N.; Dewil, M.; Van Den Bosch, L.; Billiau, A.D.; Robberecht, W.; Julien, J.P. Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 10234-10244, 10.1523/JNEUROSCI.3494-08.2008 [doi].
99. Ajami, B.; Bennett, J.L.; Krieger, C.; McNagny, K.M.; Rossi, F.M. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 1142-1149, 10.1038/nn.2887 [doi].
100. Chiu, I.M.; Morimoto, E.T.; Goodarzi, H.; Liao, J.T.; O'Keeffe, S.; Phatnani, H.P.; Muratet, M.; Carroll, M.C.; Levy, S.; Tavazoie, S.; Myers, R.M.; Maniatis, T. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell. Rep.* **2013**, *4*, 385-401, 10.1016/j.celrep.2013.06.018 [doi].
101. Zondler, L.; Feiler, M.S.; Freischmidt, A.; Ruf, W.P.; Ludolph, A.C.; Danzer, K.M.; Weishaupt, J.H. Impaired activation of ALS monocytes by exosomes. *Immunol. Cell Biol.* **2017**, *95*, 207-214, 10.1038/icb.2016.89 [doi].
102. Woodruff, T.M.; Costantini, K.J.; Taylor, S.M.; Noakes, P.G. Role of complement in motor neuron disease: animal models and therapeutic potential of complement inhibitors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *632*, 143-158.
103. Woodruff, T.M.; Costantini, K.J.; Crane, J.W.; Atkin, J.D.; Monk, P.N.; Taylor, S.M.; Noakes, P.G. The complement factor C5a contributes to pathology in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 8727-8734, 181/12/8727 [pii].
104. Heurich, B.; El Idrissi, N.B.; Donev, R.M.; Petri, S.; Claus, P.; Neal, J.; Morgan, B.P.; Ramaglia, V. Complement upregulation and activation on motor neurons and neuromuscular junction in the SOD1 G93A mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2011**, *235*, 104-109, 10.1016/j.jneuroim.2011.03.011 [doi].

105. Mantovani, S.; Gordon, R.; Macmaw, J.K.; Pfluger, C.M.; Henderson, R.D.; Noakes, P.G.; McCombe, P.A.; Woodruff, T.M. Elevation of the terminal complement activation products C5a and C5b-9 in ALS patient blood. *J. Neuroimmunol.* **2014**, *276*, 213-218, S0165-5728(14)00882-0 [pii].
106. Bahia El Idrissi, N.; Bosch, S.; Ramaglia, V.; Aronica, E.; Baas, F.; Troost, D. Complement activation at the motor end-plates in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation* **2016**, *13*, 72-016-0538-2, 10.1186/s12974-016-0538-2 [doi].
107. Wang, H.A.; Lee, J.D.; Lee, K.M.; Woodruff, T.M.; Noakes, P.G. Complement C5a-C5aR1 signalling drives skeletal muscle macrophage recruitment in the hSOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Skelet Muscle* **2017**, *7*, 10-017-0128-8, 10.1186/s13395-017-0128-8 [doi].
108. Lee, J.D.; Kumar, V.; Fung, J.N.; Ruitenber, M.J.; Noakes, P.G.; Woodruff, T.M. Pharmacological inhibition of complement C5a-C5a1 receptor signalling ameliorates disease pathology in the hSOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 689-699, 10.1111/bph.13730 [doi].
109. Gugliandolo, A.; Giacoppo, S.; Bramanti, P.; Mazzon, E. NLRP3 Inflammasome Activation in a Transgenic Amyotrophic Lateral Sclerosis Model. *Inflammation* **2018**, *41*, 93-103, 10.1007/s10753-017-0667-5 [doi].
110. Zhao, W.; Beers, D.R.; Bell, S.; Wang, J.; Wen, S.; Baloh, R.H.; Appel, S.H. TDP-43 activates microglia through NF-kappaB and NLRP3 inflammasome. *Exp. Neurol.* **2015**, *273*, 24-35, 10.1016/j.expneurol.2015.07.019 [doi].
111. Bellezza, I.; Grottelli, S.; Costanzi, E.; Scarpelli, P.; Pigna, E.; Morozzi, G.; Mezzasoma, L.; Peirce, M.J.; Moresi, V.; Adamo, S.; Minelli, A. Peroxynitrite Activates the NLRP3 Inflammasome Cascade in SOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 2350-2361, 10.1007/s12035-017-0502-x [doi].
112. Debye, B.; Schmulling, L.; Zhou, L.; Rune, G.; Beyer, C.; Johann, S. Neurodegeneration and NLRP3 inflammasome expression in the anterior thalamus of SOD1(G93A) ALS mice. *Brain Pathol.* **2018**, *28*, 14-27, 10.1111/bpa.12467 [doi].
113. Johann, S.; Heitzer, M.; Kanagaratnam, M.; Goswami, A.; Rizo, T.; Weis, J.; Troost, D.; Beyer, C. NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *Glia* **2015**, *63*, 2260-2273, 10.1002/glia.22891 [doi].
114. Heitzer, M.; Kaiser, S.; Kanagaratnam, M.; Zendedel, A.; Hartmann, P.; Beyer, C.; Johann, S. Administration of 17beta-Estradiol Improves Motoneuron Survival and Down-regulates Inflammasome Activation in Male SOD1(G93A) ALS Mice. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 8429-8443, 10.1007/s12035-016-0322-4 [doi].

115. Grottelli, S.; Mezzasoma, L.; Scarpelli, P.; Cacciatore, I.; Cellini, B.; Bellezza, I. Cyclo(His-Pro) inhibits NLRP3 inflammasome cascade in ALS microglial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **2019**, *94*, 23-31, S1044-7431(18)30241-0 [pii].
116. Trias, E.; Ibarburu, S.; Barreto-Nunez, R.; Babdor, J.; Maciel, T.T.; Guillo, M.; Gros, L.; Dubreuil, P.; Diaz-Amarilla, P.; Cassina, P.; Martinez-Palma, L.; Moura, I.C.; Beckman, J.S.; Hermine, O.; Barbeito, L. Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation* **2016**, *13*, 177-016-0620-9, 10.1186/s12974-016-0620-9 [doi].
117. Mora, J.S.; Genge, A.; Chio, A.; Estol, C.J.; Chaverri, D.; Hernandez, M.; Marin, S.; Mascias, J.; Rodriguez, G.E.; Povedano, M.; Paipa, A.; Dominguez, R.; Gamez, J.; Salvado, M.; Lunetta, C.; Ballario, C.; Riva, N.; Mandrioli, J.; Moussy, A.; Kinet, J.P.; Auclair, C.; Dubreuil, P.; Arnold, V.; Mansfield, C.D.; Hermine, O.; AB10015 STUDY GROUP Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. *Amyotroph Lateral Scler. Frontotemporal Degener* **2019**, 1-10, 10.1080/21678421.2019.1632346 [doi].
118. Perrin, S. Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature* **2014**, *507*, 423-425, 10.1038/507423a [doi].
119. Nguyen, M.D.; Julien, J.P.; Rivest, S. Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1beta in neurodegeneration. *Ann. Neurol.* **2001**, *50*, 630-639.
120. 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. Association of Regulatory T-Cell Expansion With Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Study of Humans and a Transgenic Mouse Model. *JAMA Neurol.* **2018**, *75*, 681-689, 10.1001/jamaneurol.2018.0035 [doi].
121. MIROCALS. <http://www.mirocals.eu/en/2019>).
122. Thonhoff, J.R.; Beers, D.R.; Zhao, W.; Pleitez, M.; Simpson, E.P.; Berry, J.D.; Cudkowicz, M.E.; Appel, S.H. Expanded autologous regulatory T-lymphocyte infusions in ALS: A phase I, first-in-human study. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm* **2018**, *5*, e465, 10.1212/NXI.0000000000000465 [doi].
123. Boido, M.; Piras, A.; Valsecchi, V.; Spigolon, G.; Mareschi, K.; Ferrero, I.; Vizzini, A.; Temi, S.; Mazzini, L.; Fagioli, F.; Vercelli, A. Human mesenchymal stromal cell transplantation modulates neuroinflammatory milieu in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy* **2014**, *16*, 1059-1072, 10.1016/j.jcyt.2014.02.003 [doi].

124. Hajivalili, M.; Pourgholi, F.; Kafil, H.S.; Jadidi-Niaragh, F.; Yousefi, M. Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Stem Cell. Res. Ther.* **2016**, *11*, 41-50, CSCRT-Epub-70102 [pii].
125. Mazzini, L.; Ferrero, I.; Luparello, V.; Rustichelli, D.; Gunetti, M.; Mareschi, K.; Testa, L.; Stecco, A.; Tarletti, R.; Miglioretti, M.; Fava, E.; Nasuelli, N.; Cisari, C.; Massara, M.; Vercelli, R.; Oggioni, G.D.; Carriero, A.; Cantello, R.; Monaco, F.; Fagioli, F. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp. Neurol.* **2010**, *223*, 229-237, 10.1016/j.expneurol.2009.08.007 [doi].
126. Sykova, E.; Rychmach, P.; Drahoradova, I.; Konradova, S.; Ruzickova, K.; Vorisek, I.; Forostyak, S.; Homola, A.; Bojar, M. Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. *Cell Transplant.* **2017**, *26*, 647-658, 10.3727/096368916X693716 [doi].
127. Horn, A.P.; Bernardi, A.; Luiz Frozza, R.; Grudzinski, P.B.; Hoppe, J.B.; de Souza, L.F.; Chagastelles, P.; de Souza Wyse, A.T.; Bernard, E.A.; Battastini, A.M.; Campos, M.M.; Lenz, G.; Nardi, N.B.; Salbego, C. Mesenchymal stem cell-conditioned medium triggers neuroinflammation and reactive species generation in organotypic cultures of rat hippocampus. *Stem Cells Dev.* **2011**, *20*, 1171-1181, 10.1089/scd.2010.0157 [doi].
128. Popescu, I.R.; Nicaise, C.; Liu, S.; Bisch, G.; Knippenberg, S.; Daubie, V.; Bohl, D.; Pochet, R. Neural progenitors derived from human induced pluripotent stem cells survive and differentiate upon transplantation into a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Transl. Med.* **2013**, *2*, 167-174, 10.5966/sctm.2012-0042 [doi].
129. Nizzardo, M.; Bucchia, M.; Ramirez, A.; Trombetta, E.; Bresolin, N.; Comi, G.P.; Corti, S. iPSC-derived LewisX+CXCR4+beta1-integrin+ neural stem cells improve the amyotrophic lateral sclerosis phenotype by preserving motor neurons and muscle innervation in human and rodent models. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *25*, 3152-3163, 10.1093/hmg/ddw163 [doi].
130. Cusimano, M.; Biziato, D.; Brambilla, E.; Donega, M.; Alfaro-Cervello, C.; Snider, S.; Salani, G.; Pucci, F.; Comi, G.; Garcia-Verdugo, J.M.; De Palma, M.; Martino, G.; Pluchino, S. Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord. *Brain* **2012**, *135*, 447-460, 10.1093/brain/awr339 [doi].
131. Glass, J.D.; Hertzberg, V.S.; Boulis, N.M.; Riley, J.; Federici, T.; Polak, M.; Bordeau, J.; Fournier, C.; Johe, K.; Hazel, T.; Cudkowicz, M.; Atassi, N.; Borges, L.F.; Rutkove, S.B.; Duell, J.; Patil, P.G.; Goutman, S.A.; Feldman, E.L. Transplantation of spinal cord-derived neural stem cells for ALS: Analysis of phase 1 and 2 trials. *Neurology* **2016**, *87*, 392-400, 10.1212/WNL.0000000000002889 [doi].
132. Azuaje, F. *Bioinformatics and Biomarker Discovery: "Omic" Data Analysis for Personalized Medicine*; Wiley-Blackwell: West Sussex, UK, 2010; , pp 248.

133. Verber, N.S.; Shepheard, S.R.; Sassani, M.; McDonough, H.E.; Moore, S.A.; Alix, J.J.P.; Wilkinson, I.D.; Jenkins, T.M.; Shaw, P.J. Biomarkers in Motor Neuron Disease: A State of the Art Review. *Front Neurol* **2019**, *10*, 291, 10.3389/fneur.2019.00291.
134. Turner, M.R.; Kiernan, M.C.; Leigh, P.N.; Talbot, K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. **2009**, *8*, 94-109, 10.1016/S1474-4422(08)70293-X [doi].
135. Menke, R.A.; Agosta, F.; Grosskreutz, J.; Filippi, M.; Turner, M.R. Neuroimaging Endpoints in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 11-23, 10.1007/s13311-016-0484-9 [doi].
136. Mazon, M.; Vazquez Costa, J.F.; Ten-Esteve, A.; Marti-Bonmati, L. Imaging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Neurodegenerative Diseases. The Example of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 784, 10.3389/fnins.2018.00784 [doi].
137. Ferraro, P.M.; Agosta, F.; Riva, N.; Copetti, M.; Spinelli, E.G.; Falzone, Y.; Soraru, G.; Comi, G.; Chio, A.; Filippi, M. Multimodal structural MRI in the diagnosis of motor neuron diseases. *Neuroimage Clin.* **2017**, *16*, 240-247, 10.1016/j.nicl.2017.08.002 [doi].
138. Foerster, B.R.; Callaghan, B.C.; Petrou, M.; Edden, R.A.; Chenevert, T.L.; Feldman, E.L. Decreased motor cortex gamma-aminobutyric acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **2012**, *78*, 1596-1600, 10.1212/WNL.0b013e3182563b57 [doi].
139. Stagg, C.J.; Knight, S.; Talbot, K.; Jenkinson, M.; Maudsley, A.A.; Turner, M.R. Whole-brain magnetic resonance spectroscopic imaging measures are related to disability in ALS. *Neurology* **2013**, *80*, 610-615, 10.1212/WNL.0b013e318281ccec [doi].
140. Piro, E.P.; Majors, A.W.; Mitsumoto, H.; Nelson, D.R.; Ng, T.C. 1H-MRS evidence of neurodegeneration and excess glutamate + glutamine in ALS medulla. *Neurology* **1999**, *53*, 71-79, 10.1212/wnl.53.1.71 [doi].
141. Ellis, C.M.; Simmons, A.; Jones, D.K.; Bland, J.; Dawson, J.M.; Horsfield, M.A.; Williams, S.C.; Leigh, P.N. Diffusion tensor MRI assesses corticospinal tract damage in ALS. *Neurology* **1999**, *53*, 1051-1058, 10.1212/wnl.53.5.1051 [doi].
142. Graham, J.M.; Papadakis, N.; Evans, J.; Widjaja, E.; Romanowski, C.A.; Paley, M.N.; Wallis, L.I.; Wilkinson, I.D.; Shaw, P.J.; Griffiths, P.D. Diffusion tensor imaging for the assessment of upper motor neuron integrity in ALS. *Neurology* **2004**, *63*, 2111-2119, 63/11/2111 [pii].
143. Filippini, N.; Douaud, G.; Mackay, C.E.; Knight, S.; Talbot, K.; Turner, M.R. Corpus callosum involvement is a consistent feature of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **2010**, *75*, 1645-1652, 10.1212/WNL.0b013e3181fb84d1 [doi].
144. Tang, M.; Chen, X.; Zhou, Q.; Liu, B.; Liu, Y.; Liu, S.; Chen, Z. Quantitative assessment of amyotrophic lateral sclerosis with diffusion tensor imaging in 3.0T magnetic resonance. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8*, 8295-8303.

145. Wang, S.; Poptani, H.; Woo, J.H.; Desiderio, L.M.; Elman, L.B.; McCluskey, L.F.; Krejza, J.; Melhem, E.R. Amyotrophic lateral sclerosis: diffusion-tensor and chemical shift MR imaging at 3.0 T. *Radiology* **2006**, *239*, 831-838, 2393050573 [pii].
146. Iwata, N.K.; Aoki, S.; Okabe, S.; Arai, N.; Terao, Y.; Kwak, S.; Abe, O.; Kanazawa, I.; Tsuji, S.; Ugawa, Y. Evaluation of corticospinal tracts in ALS with diffusion tensor MRI and brainstem stimulation. *Neurology* **2008**, *70*, 528-532, 10.1212/01.wnl.0000299186.72374.19 [doi].
147. Ciccarelli, O.; Behrens, T.E.; Johansen-Berg, H.; Talbot, K.; Orrell, R.W.; Howard, R.S.; Nunes, R.G.; Miller, D.H.; Matthews, P.M.; Thompson, A.J.; Smith, S.M. Investigation of white matter pathology in ALS and PLS using tract-based spatial statistics. *Hum. Brain Mapp.* **2009**, *30*, 615-624, 10.1002/hbm.20527 [doi].
148. Grolez, G.; Kyheng, M.; Lopes, R.; Moreau, C.; Timmerman, K.; Auger, F.; Kuchcinski, G.; Duhamel, A.; Jissendi-Tchofo, P.; Besson, P.; Laloux, C.; Petrault, M.; Devedjian, J.C.; Perez, T.; Pradat, P.F.; Defebvre, L.; Bordet, R.; Danel-Brunaud, V.; Devos, D. MRI of the cervical spinal cord predicts respiratory dysfunction in ALS. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1828-018-19938-2, 10.1038/s41598-018-19938-2 [doi].
149. Zurcher, N.R.; Loggia, M.L.; Lawson, R.; Chonde, D.B.; Izquierdo-Garcia, D.; Yasek, J.E.; Akeju, O.; Catana, C.; Rosen, B.R.; Cudkowicz, M.E.; Hooker, J.M.; Atassi, N. Increased in vivo glial activation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: assessed with [(11)C]-PBR28. *Neuroimage Clin.* **2015**, *7*, 409-414, 10.1016/j.nicl.2015.01.009 [doi].
150. Alshikho, M.J.; Zurcher, N.R.; Loggia, M.L.; Cernasov, P.; Chonde, D.B.; Izquierdo Garcia, D.; Yasek, J.E.; Akeju, O.; Catana, C.; Rosen, B.R.; Cudkowicz, M.E.; Hooker, J.M.; Atassi, N. Glial activation colocalizes with structural abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **2016**, *87*, 2554-2561, WNL.0000000000003427 [pii].
151. Ratai, E.M.; Alshikho, M.J.; Zurcher, N.R.; Loggia, M.L.; Cebulla, C.L.; Cernasov, P.; Reynolds, B.; Fish, J.; Seth, R.; Babu, S.; Paganoni, S.; Hooker, J.M.; Atassi, N. Integrated imaging of [(11)C]-PBR28 PET, MR diffusion and magnetic resonance spectroscopy (1)H-MRS in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroimage Clin.* **2018**, *20*, 357-364, S2213-1582(18)30248-1 [pii].
152. Vucic, S.; Rutkove, S.B. Neurophysiological biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* **2018**, *31*, 640-647, 10.1097/WCO.0000000000000593 [doi].
153. Rutkove, S.B. Electrical impedance myography: Background, current state, and future directions. *Muscle Nerve* **2009**, *40*, 936-946, 10.1002/mus.21362 [doi].
154. Rutkove, S.B.; Lee, K.S.; Shiffman, C.A.; Aaron, R. Test-retest reproducibility of 50 kHz linear-electrical impedance myography. *Clin. Neurophysiol.* **2006**, *117*, 1244-1248, S1388-2457(06)00094-0 [pii].

155. Rutkove, S.B.; Zhang, H.; Schoenfeld, D.A.; Raynor, E.M.; Shefner, J.M.; Cudkovicz, M.E.; Chin, A.B.; Aaron, R.; Shiffman, C.A. Electrical impedance myography to assess outcome in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. *Clin. Neurophysiol.* **2007**, *118*, 2413-2418, S1388-2457(07)00409-9 [pii].
156. Rutkove, S.B.; Caress, J.B.; Cartwright, M.S.; Burns, T.M.; Warder, J.; David, W.S.; Goyal, N.; Maragakis, N.J.; Clawson, L.; Benatar, M.; Usher, S.; Sharma, K.R.; Gautam, S.; Narayanaswami, P.; Raynor, E.M.; Watson, M.L.; Shefner, J.M. Electrical impedance myography as a biomarker to assess ALS progression. *Amyotroph Lateral Scler.* **2012**, *13*, 439-445, 10.3109/17482968.2012.688837 [doi].
157. Rutkove, S.B.; Caress, J.B.; Cartwright, M.S.; Burns, T.M.; Warder, J.; David, W.S.; Goyal, N.; Maragakis, N.J.; Benatar, M.; Sharma, K.R.; Narayanaswami, P.; Raynor, E.M.; Watson, M.L.; Shefner, J.M. Electrical impedance myography correlates with standard measures of ALS severity. *Muscle Nerve* **2014**, *49*, 441-443, 10.1002/mus.24128 [doi].
158. Wang, L.L.; Spieker, A.J.; Li, J.; Rutkove, S.B. Electrical impedance myography for monitoring motor neuron loss in the SOD1 G93A amyotrophic lateral sclerosis rat. *Clin. Neurophysiol.* **2011**, *122*, 2505-2511, 10.1016/j.clinph.2011.04.021 [doi].
159. Li, J.; Sung, M.; Rutkove, S.B. Electrophysiologic biomarkers for assessing disease progression and the effect of riluzole in SOD1 G93A ALS mice. *PLoS One* **2013**, *8*, e65976, 10.1371/journal.pone.0065976 [doi].
160. Gooch, C.L.; Shefner, J.M. ALS surrogate markers. MUNE. *Amyotroph Lateral Scler. Other Motor Neuron. Disord.* **2004**, *5 Suppl 1*, 104-107, M2A041EWPLKD27F6 [pii].
161. Shefner, J.M.; Watson, M.L.; Simionescu, L.; Caress, J.B.; Burns, T.M.; Maragakis, N.J.; Benatar, M.; David, W.S.; Sharma, K.R.; Rutkove, S.B. Multipoint incremental motor unit number estimation as an outcome measure in ALS. *Neurology* **2011**, *77*, 235-241, 10.1212/WNL.0b013e318225aabf [doi].
162. Neuwirth, C.; Barkhaus, P.E.; Burkhardt, C.; Castro, J.; Czell, D.; de Carvalho, M.; Nandedkar, S.; Stalberg, E.; Weber, M. Tracking motor neuron loss in a set of six muscles in amyotrophic lateral sclerosis using the Motor Unit Number Index (MUNIX): a 15-month longitudinal multicentre trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **2015**, *86*, 1172-1179, 10.1136/jnnp-2015-310509 [doi].
163. Neuwirth, C.; Barkhaus, P.E.; Burkhardt, C.; Castro, J.; Czell, D.; de Carvalho, M.; Nandedkar, S.; Stalberg, E.; Weber, M. Motor Unit Number Index (MUNIX) detects motor neuron loss in pre-symptomatic muscles in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* **2017**, *128*, 495-500, S1388-2457(16)31006-9 [pii].
164. Jacobsen, A.B.; Bostock, H.; Tankisi, H. Following disease progression in motor neuron disorders with 3 motor unit number estimation methods. *Muscle Nerve* **2019**, *59*, 82-87, 10.1002/mus.26304 [doi].

165. Escorcio-Bezerra, M.L.; Abrahao, A.; de Castro, I.; Chieia, M.A.T.; de Azevedo, L.A.; Pinheiro, D.S.; de Oliveira Braga, N.I.; de Oliveira, A.S.B.; Manzano, G.M. MUNIX: Reproducibility and clinical correlations in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* **2016**, *127*, 2979-2984, S1388-2457(16)30441-2 [pii].
166. Fukada, K.; Matsui, T.; Furuta, M.; Hirozawa, D.; Matsui, M.; Kajiyama, Y.; Shimizu, M.; Kinoshita, M.; Mochizuki, H.; Sawada, J.I.; Hazama, T. The Motor Unit Number Index of Subclinical Abnormality in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Clin. Neurophysiol.* **2016**, *33*, 564-568, 10.1097/WNP.000000000000296 [doi].
167. Bostock, H.; Cikurel, K.; Burke, D. Threshold tracking techniques in the study of human peripheral nerve. *Muscle Nerve* **1998**, *21*, 137-158, 10.1002/(SICI)1097-4598(199802)21:23.O.CO;2-C [pii].
168. Park, S.B.; Kiernan, M.C.; Vucic, S. Axonal Excitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis : Axonal Excitability in ALS. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 78-90, 10.1007/s13311-016-0492-9 [doi].
169. Shibuta, Y.; Shimatani, Y.; Nodera, H.; Izumi, Y.; Kaji, R. Increased variability of axonal excitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* **2013**, *124*, 2046-2053, 10.1016/j.clinph.2013.02.117 [doi].
170. Kanai, K.; Kuwabara, S.; Arai, K.; Sung, J.Y.; Ogawara, K.; Hattori, T. Muscle cramp in Machado-Joseph disease: altered motor axonal excitability properties and mexiletine treatment. *Brain* **2003**, *126*, 965-973, 10.1093/brain/awg073 [doi].
171. Kanai, K.; Kuwabara, S.; Misawa, S.; Tamura, N.; Ogawara, K.; Nakata, M.; Sawai, S.; Hattori, T.; Bostock, H. Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain* **2006**, *129*, 953-962, awl024 [pii].
172. Kanai, K.; Shibuya, K.; Sato, Y.; Misawa, S.; Nasu, S.; Sekiguchi, Y.; Mitsuma, S.; Iose, S.; Fujimaki, Y.; Ohmori, S.; Koga, S.; Kuwabara, S. Motor axonal excitability properties are strong predictors for survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **2012**, *83*, 734-738, 10.1136/jnnp-2011-301782 [doi].
173. Tarasiuk, J.; Kulakowska, A.; Drozdowski, W.; Kornhuber, J.; Lewczuk, P. CSF markers in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neural Transm. (Vienna)* **2012**, *119*, 747-757, 10.1007/s00702-012-0806-y [doi].
174. Costa, J.; de Carvalho, M. Emerging molecular biomarker targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Chim. Acta* **2016**, *455*, 7-14, 10.1016/j.cca.2016.01.011 [doi].
175. Vu, L.T.; Bowser, R. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 119-134, 10.1007/s13311-016-0503-x [doi].

176. Majumder, V.; Gregory, J.M.; Barria, M.A.; Green, A.; Pal, S. TDP-43 as a potential biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol.* **2018**, *18*, 90-018-1091-7, 10.1186/s12883-018-1091-7 [doi].
177. Bjornevik, K.; Zhang, Z.; O'Reilly, E.J.; Berry, J.D.; Clish, C.B.; Deik, A.; Jeanfavre, S.; Kato, I.; Kelly, R.S.; Kolonel, L.N.; Liang, L.; Marchand, L.L.; McCullough, M.L.; Paganoni, S.; Pierce, K.A.; Schwarzschild, M.A.; Shadyab, A.H.; Wactawski-Wende, J.; Wang, D.D.; Wang, Y.; Manson, J.E.; Ascherio, A. Prediagnostic plasma metabolomics and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **2019**, 10.1212/WNL.0000000000007401 [pii].
178. Calvo, A.C.; Atencia Cibreiro, G.; Torre Merino, P.; Roy, J.F.; Galiana, A.; Juárez Rufián, A.; Cano, J.M.; Martín, M.A.; Moreno, L.; Larrodé, P.; Cordero Vázquez, P.; Galán, L.; Mora, J.; Muñoz-Blanco, J.L.; Muñoz, M.J.; Zaragoza, P.; Pegoraro, E.; Sorarù, G.; Mora, M.; Lunetta, C.; Penco, S.; Tarlarini, C.; Esteban, J.; Osta, R.; García Redondo, A. Collagen XIX Alpha 1 Improves Prognosis in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Aging and disease* **2019**, *10*, 278, 10.14336/AD.2018.0917. Available online: http://www.aginganddisease.org/EN/article/article_147814.shtml}.
179. Gagliardi, D.; Meneri, M.; Saccomanno, D.; Bresolin, N.; Comi, G.P.; Corti, S. Diagnostic and Prognostic Role of Blood and Cerebrospinal Fluid and Blood Neurofilaments in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Review of the Literature. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 10.3390/ijms20174152, E4152 [pii].
180. Xu, Z.; Henderson, R.D.; David, M.; McCombe, P.A. Neurofilaments as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **2016**, *11*, e0164625, 10.1371/journal.pone.0164625 [doi].
181. Blasco, H.; Patin, F.; Madji Hounoum, B.; Gordon, P.H.; Vourc'h, P.; Andres, C.R.; Corcia, P. Metabolomics in amyotrophic lateral sclerosis: how far can it take us? *Eur. J. Neurol.* **2016**, *23*, 447-454, 10.1111/ene.12956 [doi].
182. Lanznaster, D.; de Assis, D.R.; Corcia, P.; Pradat, P.F.; Blasco, H. Metabolomics Biomarkers: A Strategy Toward Therapeutics Improvement in ALS. *Front. Neurol.* **2018**, *9*, 1126, 10.3389/fneur.2018.01126 [doi].
183. Andreadou, E.; Kapaki, E.; Kokotis, P.; Paraskevas, G.P.; Katsaros, N.; Libitaki, G.; Zis, V.; Sfagos, C.; Vassilopoulos, D. Plasma glutamate and glycine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: the effect of riluzole treatment. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2008**, *110*, 222-226, S0303-8467(07)00323-X [pii].
184. Lawton, K.A.; Brown, M.V.; Alexander, D.; Li, Z.; Wulff, J.E.; Lawson, R.; Jaffa, M.; Milburn, M.V.; Ryals, J.A.; Bowser, R.; Cudkowicz, M.E.; Berry, J.D.; Northeast ALS Consortium Plasma metabolomic biomarker panel to distinguish patients with amyotrophic lateral sclerosis from disease mimics. *Amyotroph Lateral Scler. Frontotemporal Degener* **2014**, *15*, 362-370, 10.3109/21678421.2014.908311 [doi].

185. Bozik, M.E.; Mitsumoto, H.; Brooks, B.R.; Rudnicki, S.A.; Moore, D.H.; Zhang, B.; Ludolph, A.; Cudkowicz, M.E.; van den Berg, L.H.; Mather, J.; Petzinger, T., Jr; Archibald, D. A post hoc analysis of subgroup outcomes and creatinine in the phase III clinical trial (EMPOWER) of dexamipexole in ALS. *Amyotroph Lateral Scler. Frontotemporal Degener* **2014**, *15*, 406-413, 10.3109/21678421.2014.943672 [doi].
186. Toivonen, J.M.; Manzano, R.; Olivan, S.; Zaragoza, P.; Garcia-Redondo, A.; Osta, R. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* **2014**, *9*, e89065, 10.1371/journal.pone.0089065 [doi].
187. Benigni, M.; Ricci, C.; Jones, A.R.; Giannini, F.; Al-Chalabi, A.; Battistini, S. Identification of miRNAs as Potential Biomarkers in Cerebrospinal Fluid from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Neuromolecular Med.* **2016**, *18*, 551-560, 10.1007/s12017-016-8396-8 [doi].
188. Ricci, C.; Marzocchi, C.; Battistini, S. MicroRNAs as Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells* **2018**, *7*, 10.3390/cells7110219, E219 [pii].
189. Joilin, G.; Leigh, P.N.; Newbury, S.F.; Hafezparast, M. An Overview of MicroRNAs as Biomarkers of ALS. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 186, 10.3389/fneur.2019.00186 [doi].
190. Shephard, S.R.; Wu, J.; Cardoso, M.; Wiklendt, L.; Dinning, P.G.; Chataway, T.; Schultz, D.; Benatar, M.; Rogers, M.L. Urinary p75(ECD): A prognostic, disease progression, and pharmacodynamic biomarker in ALS. *Neurology* **2017**, *88*, 1137-1143, 10.1212/WNL.0000000000003741 [doi].
191. Shi, N.; Kawano, Y.; Tateishi, T.; Kikuchi, H.; Osoegawa, M.; Ohyagi, Y.; Kira, J. Increased IL-13-producing T cells in ALS: positive correlations with disease severity and progression rate. *J. Neuroimmunol.* **2007**, *182*, 232-235, S0165-5728(06)00384-5 [pii].
192. Kuhle, J.; Lindberg, R.L.; Regeniter, A.; Mehling, M.; Steck, A.J.; Kappos, L.; Czaplinski, A. Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **2009**, *16*, 771-774, 10.1111/j.1468-1331.2009.02560.x [doi].
193. Mitchell, R.M.; Freeman, W.M.; Randazzo, W.T.; Stephens, H.E.; Beard, J.L.; Simmons, Z.; Connor, J.R. A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **2009**, *72*, 14-19, 10.1212/01.wnl.0000333251.36681.a5 [doi].
194. Tateishi, T.; Yamasaki, R.; Tanaka, M.; Matsushita, T.; Kikuchi, H.; Isobe, N.; Ohyagi, Y.; Kira, J. CSF chemokine alterations related to the clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2010**, *222*, 76-81, 10.1016/j.jneuroim.2010.03.004 [doi].
195. Furukawa, T.; Matsui, N.; Fujita, K.; Miyashiro, A.; Nodera, H.; Izumi, Y.; Shimizu, F.; Miyamoto, K.; Takahashi, Y.; Kanda, T.; Kusunoki, S.; Kaji, R. Increased proinflammatory cytokines in sera of patients with multifocal motor neuropathy. *J. Neurol. Sci.* **2014**, *346*, 75-79, 10.1016/j.jns.2014.07.059 [doi].

196. Italiani, P.; Carlesi, C.; Giungato, P.; Puxeddu, I.; Borroni, B.; Bossu, P.; Migliorini, P.; Siciliano, G.; Boraschi, D. Evaluating the levels of interleukin-1 family cytokines in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation* **2014**, *11*, 94-2094-11-94, 10.1186/1742-2094-11-94 [doi].
197. Ehrhart, J.; Smith, A.J.; Kuzmin-Nichols, N.; Zesiewicz, T.A.; Jahan, I.; Shytle, R.D.; Kim, S.H.; Sanberg, C.D.; Vu, T.H.; Gooch, C.L.; Sanberg, P.R.; Garbuzova-Davis, S. Humoral factors in ALS patients during disease progression. *J. Neuroinflammation* **2015**, *12*, 127-015-0350-4, 10.1186/s12974-015-0350-4 [doi].
198. Furukawa, T.; Matsui, N.; Fujita, K.; Nodera, H.; Shimizu, F.; Miyamoto, K.; Takahashi, Y.; Kanda, T.; Kusunoki, S.; Izumi, Y.; Kaji, R. CSF cytokine profile distinguishes multifocal motor neuropathy from progressive muscular atrophy. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm* **2015**, *2*, e138, 10.1212/NXI.000000000000138 [doi].
199. Ngo, S.T.; Steyn, F.J.; Huang, L.; Mantovani, S.; Pfluger, C.M.; Woodruff, T.M.; O'Sullivan, J.D.; Henderson, R.D.; McCombe, P.A. Altered expression of metabolic proteins and adipokines in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **2015**, *357*, 22-27, 10.1016/j.jns.2015.06.053 [doi].
200. Lu, C.H.; Allen, K.; Oei, F.; Leoni, E.; Kuhle, J.; Tree, T.; Fratta, P.; Sharma, N.; Sidle, K.; Howard, R.; Orrell, R.; Fish, M.; Greensmith, L.; Pearce, N.; Gallo, V.; Malaspina, A. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm* **2016**, *3*, e244, 10.1212/NXI.0000000000000244 [doi].
201. Blasco, H.; Garcon, G.; Patin, F.; Veyrat-Durebex, C.; Boyer, J.; Devos, D.; Vourc'h, P.; Andres, C.R.; Corcia, P. Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. *Can. J. Neurol. Sci.* **2017**, *44*, 90-95, 10.1017/cjn.2016.284 [doi].
202. Guo, J.; Yang, X.; Gao, L.; Zang, D. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS. *Brain Behav.* **2017**, *7*, e00637, 10.1002/brb3.637 [doi].
203. Hu, Y.; Cao, C.; Qin, X.Y.; Yu, Y.; Yuan, J.; Zhao, Y.; Cheng, Y. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9094-017-09097-1, 10.1038/s41598-017-09097-1 [doi].
204. Chen, X.; Hu, Y.; Cao, Z.; Liu, Q.; Cheng, Y. Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2122, 10.3389/fimmu.2018.02122 [doi].
205. Prado, L.G.R.; Rocha, N.P.; de Souza, L.C.; Bicalho, I.C.S.; Gomez, R.S.; Vidigal-Lopes, M.; Braz, N.F.T.; Vieira, E.L.M.; Teixeira, A.L. Longitudinal assessment of clinical and inflammatory markers in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **2018**, *394*, 69-74, S0022-510X(18)30354-X [pii].

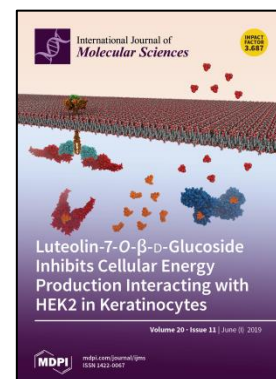
206. Andres-Benito, P.; Moreno, J.; Dominguez, R.; Aso, E.; Povedano, M.; Ferrer, I. Inflammatory Gene Expression in Whole Peripheral Blood at Early Stages of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Neurol.* **2017**, *8*, 546, 10.3389/fneur.2017.00546 [doi].
207. Vlam, L.; Stam, M.; de Jager, W.; Cats, E.A.; van den Berg, L.H.; van der Pol, W.L. Cytokine profiles in multifocal motor neuropathy and progressive muscular atrophy. *J. Neuroimmunol.* **2015**, *286*, 1-4, 10.1016/j.jneuroim.2015.06.008 [doi].
208. Martinez-Merino, L.; Iridoy, M.; Galbete, A.; Roldan, M.; Rivero, A.; Acha, B.; Irun, P.; Canosa, C.; Pocovi, M.; Mendioroz, M.; Jerico, I. Evaluation of Chitotriosidase and CC-Chemokine Ligand 18 as Biomarkers of Microglia Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis.* **2018**, *18*, 208-215, 10.1159/000490920 [doi].
209. Liu, J.; Gao, L.; Zang, D. Elevated Levels of IFN-gamma in CSF and Serum of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* **2015**, *10*, e0136937, 10.1371/journal.pone.0136937 [doi].
210. Mitchell, R.M.; Simmons, Z.; Beard, J.L.; Stephens, H.E.; Connor, J.R. Plasma biomarkers associated with ALS and their relationship to iron homeostasis. *Muscle Nerve* **2010**, *42*, 95-103, 10.1002/mus.21625 [doi].
211. Martinez, H.R.; Escamilla-Ocanas, C.E.; Camara-Lemarroy, C.R.; Gonzalez-Garza, M.T.; Moreno-Cuevas, J.; Garcia Sarreon, M.A. Increased cerebrospinal fluid levels of cytokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1beta (MIP-1beta) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia* **2017**, S0213-4853(17)30280-3 [pii].
212. Gao, L.; Zhou, S.; Cai, H.; Gong, Z.; Zang, D. VEGF levels in CSF and serum in mild ALS patients. *J. Neurol. Sci.* **2014**, *346*, 216-220, 10.1016/j.jns.2014.08.031 [doi].
213. Yang, X.; Gao, L.; Wu, X.; Zhang, Y.; Zang, D. Increased levels of MIP-1alpha in CSF and serum of ALS. *Acta Neurol. Scand.* **2016**, *134*, 94-100, 10.1111/ane.12513 [doi].
214. Nagel, G.; Peter, R.S.; Rosenbohm, A.; Koenig, W.; Dupuis, L.; Rothenbacher, D.; Ludolph, A.C. Adipokines, C-reactive protein and Amyotrophic Lateral Sclerosis - results from a population-based ALS registry in Germany. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4374-017-04706-5, 10.1038/s41598-017-04706-5 [doi].
215. Lunetta, C.; Lizio, A.; Maestri, E.; Sansone, V.A.; Mora, G.; Miller, R.G.; Appel, S.H.; Chio, A. Serum C-Reactive Protein as a Prognostic Biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* **2017**, *74*, 660-667, 10.1001/jamaneurol.2016.6179 [doi].
216. Pagliardini, V.; Pagliardini, S.; Corrado, L.; Lucenti, A.; Panigati, L.; Bersano, E.; Servo, S.; Cantello, R.; D'Alfonso, S.; Mazzini, L. Chitotriosidase and lysosomal enzymes as potential biomarkers of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: a survey clinic-based study. *J. Neurol. Sci.* **2015**, *348*, 245-250, 10.1016/j.jns.2014.12.016 [doi].

217. Steinacker, P.; Verde, F.; Fang, L.; Feneberg, E.; Oeckl, P.; Roeber, S.; Anderl-Straub, S.; Danek, A.; Diehl-Schmid, J.; Fassbender, K.; Fliessbach, K.; Foerstl, H.; Giese, A.; Jahn, H.; Kassubek, J.; Kornhuber, J.; Landwehrmeyer, G.B.; Lauer, M.; Pinkhardt, E.H.; Prudlo, J.; Rosenbohm, A.; Schneider, A.; Schroeter, M.L.; Tumani, H.; von Arnim, C.A.F.; Weishaupt, J.; Weydt, P.; Ludolph, A.C.; Yilmazer Hanke, D.; Otto, M.; FTLDc study group Chitotriosidase (CHIT1) is increased in microglia and macrophages in spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis and cerebrospinal fluid levels correlate with disease severity and progression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **2018**, *89*, 239-247, 10.1136/jnnp-2017-317138 [doi].
218. Benatar, M.; Boylan, K.; Jeromin, A.; Rutkove, S.B.; Berry, J.; Atassi, N.; Bruijn, L. ALS biomarkers for therapy development: State of the field and future directions. *Muscle Nerve* **2016**, *53*, 169-182, 10.1002/mus.24979 [doi].
219. The Jackson Laboratory Genotyping Protocol Name: Tg(SOD1). https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5_MASTER_PROTOCOL_ID,P5_JRS_CODE:24173,002726 (accessed 09/17, 2019).
220. Simon, M.M.; Hausmann, M.; Tran, T.; Ebnet, K.; Tschopp, J.; ThaHla, R.; Mullbacher, A. In vitro- and ex vivo-derived cytolytic leukocytes from granzyme A x B double knockout mice are defective in granule-mediated apoptosis but not lysis of target cells. *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 1781-1786.
221. Moreno-Igoa, M.; Calvo, A.C.; Penas, C.; Manzano, R.; Olivan, S.; Munoz, M.J.; Mancuso, R.; Zaragoza, P.; Aguilera, J.; Navarro, X.; Osta Pinzolas, R. Fragment C of tetanus toxin, more than a carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *J. Mol. Med. (Berl)* **2010**, *88*, 297-308, 10.1007/s00109-009-0556-y [doi].
222. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402-408, 10.1006/meth.2001.1262 [doi].

ANEXOS



8.1. Anexo 1



Review

Are circulating cytokines reliable biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis?

Moreno-Martinez, L.; Calvo, A.C.; Muñoz, M.J. and Osta, R.

International Journal of Molecular Science. 2019, Volume 20, Issue 11, 2759. doi: 10.3390/ijms20112759

Review

Are Circulating Cytokines Reliable Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis?

Laura Moreno-Martinez , Ana Cristina Calvo *, María Jesús Muñoz and Rosario Osta

Laboratory of Genetics and Biochemistry (LAGENBIO), Faculty of Veterinary-IIS Aragón, IA2-CITA, CIBERNED, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain; lauramm@unizar.es (L.M.-M.); mjmunoz@unizar.es (M.J.M.); osta@unizar.es (R.O.)

* Correspondence: accalvo@unizar.es

Received: 30 April 2019; Accepted: 3 June 2019; Published: 5 June 2019



Abstract: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease that has no effective treatment. The lack of any specific biomarker that can help in the diagnosis or prognosis of ALS has made the identification of biomarkers an urgent challenge. Multiple panels have shown alterations in levels of numerous cytokines in ALS, supporting the contribution of neuroinflammation to the progressive motor neuron loss. However, none of them is fully sensitive and specific enough to become a universal biomarker for ALS. This review gathers the numerous circulating cytokines that have been found dysregulated in both ALS animal models and patients. Particularly, it highlights the opposing results found in the literature to date, and points out another potential application of inflammatory cytokines as therapeutic targets.

Keywords: cytokines; biomarkers; amyotrophic lateral sclerosis; blood; plasma; serum; cerebrospinal fluid; diagnosis; prognosis; inflammation

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is one of the most serious motor neuron diseases, and the most common adult motor neuron disease. It is characterized by loss of the cortex, brainstem, and spinal cord motor neurons (MNs), leading to muscle paralysis, and finally premature death due to respiratory failure within 2–5 years after diagnosis. Unfortunately, to date, no effective therapies able to cure the disease are available. More than 90% of ALS cases are sporadic with unknown causes. On the other hand, around 10% of ALS patients have a family history, involving mutations in a number of genes, such as Cu²⁺/Zn²⁺ superoxide dismutase 1 (SOD1), TAR DNA binding protein 43 (TDP-43), fused in sarcoma (FUS) and chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72) repeat expansions [1]. These mutations found in ALS have allowed the development of animal models that are helpful in the study of this disease. One of the best characterized animal models for ALS is the SOD1G93A mouse model, which carries a G93A mutation (substitution of Glycine to Alanine at codon 93) in the human SOD1 gene, and presents both clinical and pathological characteristics of ALS patients [2].

The diagnosis of ALS is based on clinical tests and electrophysiological studies [3]. However, there is not a definitive diagnostic test for ALS, and the difficulty to reach it leads to the delay of diagnosis up to one year after the onset of symptoms. In addition, although the ALS Functional Rating Scale–Revised (ALSFRS-R) can functionally measure ALS progression [4], the prognosis in each patient still remains uncertain and challenging to anticipate.

Numerous mechanisms have been proposed to explain the degeneration of motor neurons, including misfolded protein aggregation and impaired degradation, glutamate excitotoxicity, increased oxidative stress, neuroinflammation and mitochondrial dysfunction [5]. However, the cause of motor neuron degeneration in ALS is still unclear.

2. The Necessity of Identifying Biomarkers for ALS

There is an imperious need to identify biomarkers that can help diagnose the disease at earlier stages and also to predict the course of the disease that allow following of more accurate therapeutic strategies. The ideal biomarker should be sensitive enough to diagnose ALS at the pre-symptomatic stage; specific for ALS and able to discriminate from other clinically similar neurodegenerative diseases; able to predict the progression of the disease in each patient; and easily accessible and applicable for all patients, despite their physical condition [6]. Although the origin of ALS remains unknown, multiple panels of biomarkers have been described in ALS patients and murine models to explain the progressive motor neuron loss and muscle atrophy, including imaging, electrophysiological and wet biomarkers [7].

Neuroimaging biomarkers allow a faithful visualization of the structural alterations happening in the tissue of study when comparing them with healthy tissues. Different brain imaging techniques have been used to detect these pathological changes in ALS patients, such as magnetic resonance imaging (MRI), magnetic resonance spectroscopy (MRS), diffusion tensor imaging (DTI) and positron emission tomography (PET) [8,9]. As a result of using these techniques, some pathological alterations regarding cortical atrophy, neuronal integrity and brain white matter abnormalities have been positively correlated with progression of the disease or resulted helpful in the diagnosis [10–13]. Although some promising imaging biomarkers have been found, none of them is fully sensitive and specific enough for ALS diagnosis or prognosis.

Numerous neurophysiologic biomarkers have been identified and proposed as biomarkers that help in the early diagnosis and monitoring of the progression of the disease [14]. Transcranial magnetic stimulation (TMS) technique can detect cortical hyperexcitability at early stages of the disease, which has been correlated with upper motor neuron dysfunction [15]. On the other hand, the course of ALS can be monitored by assessing lower motor neuron dysfunction using electrical impedance myography, axonal excitability testing, the motor unit number index and muscle ultrasonography [15–17]. However, despite the potential neurophysiological biomarkers found so far in assessing progression and early diagnosis, further studies should be conducted involving larger ALS cohorts [15].

Multiple molecular markers have been described in cerebrospinal fluid (CSF), plasma, serum, and even urine and saliva. Unlike CSF, the other fluids possess the advantage of being easily accessible and do not require invasive methods to obtain them, which is an important feature of the ideal biomarker. For this reason, over the last decades, several studies have been conducted to discover new biomarkers in biofluids that are derived from different pathological mechanisms of ALS [18–22]. The best considered biomarkers candidates are inflammatory molecules, metabolic markers and neurofilaments (NFs) [23,24].

To date, NFs are the most promising biomarkers for ALS. Particularly, both NF heavy chain (NFH) and NF light chain (NFL) levels measured in CSF and blood samples can be used to differentiate ALS patients from healthy subjects and/or other neurological diseases [25]. Furthermore, NFH and NFL levels in CSF were negatively correlated with disease duration, which address NFs as potential biomarkers for both diagnosis and prognosis of ALS [25].

Regarding inflammatory mediators, large panels of cytokines, including numerous interleukins, and immune cells, such as T regulatory cells (Treg), have been identified in CSF, plasma or serum, and have been correlated with faster or slower progression [26–28]. Cytokines and other inflammatory proteins will be discussed in depth in the following sections.

The study of metabolic alterations in ALS patients is an increasing field of knowledge and more studies are needed to identify more reliable biomarkers related to metabolic changes in different tissues, such as CSF, blood and muscle [29,30]. For example, findings about glutamate levels in CSF as a metabolic biomarker of disease progression in patients remain controversial [19]. Nevertheless, in plasma samples, glutamate levels were increased and correlated with the disease duration and with patients that exhibited spinal onset [31,32]. In addition, glutamate levels can be used as a metabolic biomarker in serum in response to drug intervention [33]. On the other hand, mass spectrometry has allowed the identification of different metabolic profiles where several amino acids have shown

different levels in blood and CSF of ALS patients compared to their controls; these metabolites include arginine, lysine, serine and leucine, among others [19]. Other metabolites to consider are creatine and creatinine, which have been found dysregulated in CSF and blood [19,32], and used as molecular targets in a clinical trial [34]. Although altered metabolic profiles have been described in plasma samples of ALS patients, more reliable biomarkers that can contribute to disease progression and survival need to be identified [19].

microRNAs (miRNAs) are other potential biomarkers mainly due to their remarkable stability in body fluids. They have been found altered in CSF, plasma and serum from ALS patients and the SOD1G93A mouse model, such as MIR206, MIR143-3p, MIR338-3p [35–38]. Although some of these miRNAs are not specific for ALS, such as MIR206, it has been suggested that their combination could form part of a more integrative approach to help with ALS diagnosis and prognosis [38].

In urine, only one biomarker with prognostic value for ALS has been described, the extracellular domain of p75 neurotrophin receptor (p75^{ECD}), whose levels showed an association with disease progression [39].

In spite of the fact that numerous potential biomarkers have been identified so far, none of them separately has sufficient sensitivity or specificity to become a universal biomarker for ALS. The lack of a robust biomarker is also reflected by some contradictory results and inconsistencies found in the literature, possibly due to patient heterogeneity and the complex scenario comprising this disease.

3. The Role of The Immune System in ALS

The dysregulation of the immune system in ALS results in increased central and peripheral inflammatory responses [40]. Neuroinflammation is characterized by microglial activation, astrogliosis, infiltration of T lymphocytes and monocytes, and overproduction of inflammatory cytokines [41–43]. Both innate and adaptive immune responses are involved in ALS progression and can promote either neuroprotection or neurotoxicity depending on disease stage, evidencing a dual role of inflammation in ALS [44]. Initially, there is an early anti-inflammatory or neuroprotective phase, where neurotrophic factors and anti-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-4 and IL-10, are secreted by surrounding astrocytes and M2 microglia. As the disease progresses, the neuroprotective response changes to a cytotoxic phase due to the activation of M1 microglia and the consequent release of toxic factors, including reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α , which causes progressive injury to the MN [45].

Apart from microglia and astrocytes, T lymphocytes of the adaptive immune response also play a relevant role in the neurodegeneration observed in ALS. Especially, CD4+ T helper (Th) lymphocytes, including Th2 lymphocytes and Treg, are found in the early neuroprotective compensatory response; on the contrary, CD8+ T cytotoxic lymphocytes, such as Th1 and Th17 lymphocytes, are observed at later stages of the disease [45,46]. Both types of T lymphocytes have shown a dual role: Th1 and Th17 expression was found elevated in blood from ALS patients [47], whereas an upregulation of Treg in blood was associated with slower progression of the disease [48]. Similarly, increasing levels of Treg in animal models at early stages in the disease prolonged survival [49].

Other cells involved in MN degeneration are monocytes and macrophages. They have been found activated in peripheral blood and in CNS, especially in the spinal cord, due to the existent disruption of the blood-spinal cord barrier, in both ALS patients and murine models [50,51]. In line with this, some components of the complement system, which participate in the recruitment of mononuclear cells and macrophages, have been found elevated in CSF, blood, spinal cord and skeletal muscle from ALS patients or murine models [42,52,53]. However, the role of the complement system in ALS pathogenesis remains controversial due to the diverging results based on the great inter-individual differences during disease progression, although aberrant activation of the complement system is suggested to be involved in the pathophysiology in ALS animal models and patients [52].

More recently, the relevant role of the mutation C9orf72 in myeloid cells opened the door to altered microglial function that can link the connection between autoimmunity and ALS/FTD. Some studies on

heterozygous *C9orf72* (*C9orf72*^{+/-}) mice have suggested an altered myeloid cell function and systemic immunity. Accordingly, similar immunological consequences have been observed in ALS patients. Therefore, the loss of function of *C9orf72* together with a combination of mutations of ALS/FTD genes could promote neurodegeneration [54]. Finally, the consequence of an altered microglia in both mutant *SOD1* mice and patients is an amplified generation of pro-inflammatory cytokines that can trigger TNF- α -mediated apoptosis [55].

Despite the diverse humoral and cellular factors being found to be dysregulated, supporting the evident role of neuroinflammation in ALS pathology, to date it is still unclear how these inflammatory mediators can influence the progression of the disease and how they can be helpful in the diagnosis of ALS.

4. Dysregulation of Cytokines in Biofluids

A high number of studies have been conducted to find dysregulated cytokines in CSF and blood that can become potential biomarkers for ALS, mainly involving ALS patients, although few studies have been also performed in ALS animal models.

4.1. Interleukins

Interleukins comprise of a large family of cytokines that can exert both pro-inflammatory and anti-inflammatory actions. They are mainly synthesized by T cells, macrophages and endothelial cells promoting the development and differentiation of T and B cells, and hematopoietic cells. Numerous interleukins have been found elevated in CSF and/or blood from ALS patients compared to the levels measured in controls and/or patients with other non-inflammatory neurological disorders (OND): IL-1Ra, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IL-17A, IL-18 and IL-21 [26,47,56–70] (Table 1). Some of these interleukins follow the same pattern in the *SOD1G93A* model. Increasing levels of IL-2, IL-6, IL-10, IL-13 and IL-17B R in the transgenic (TG) mice are observed at an early stage of the disease [71]. In contrast, few studies reported decreasing levels of circulating IL-2, IL-5, IL-6 and IL-10 in ALS patients [58,63,72], whereas others found no significant differences in the levels of IL-2 and IL-6 in CSF or blood between ALS patients and their controls [73,74].

Table 1. Interleukins (IL) found dysregulated and proposed as biomarkers in biofluids from ALS animal models and patients.

Cytokine	Subject	Biofluid	Significance	Reference
IL-1Ra	Patients	Blood	Higher in ALS patients than in OND	[61]
IL-1 β	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND	[26,60,68]
IL-2	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice Negative correlation with longevity	[71] [71]
	Patients	CSF, blood Blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND Lower in ALS than healthy controls Predictor of poor survival	[26,58,67,69,70] [63] [26]
IL-4	Patients	CSF, blood CSF	Higher in ALS patients than controls and/or OND Higher levels associated with slower disease progression	[26,64] [64]
IL-5	Patients	Blood	Higher in ALS patients than healthy controls	[26]
			Lower in ALS patients than healthy controls	[63]
IL-6	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice Negative correlation with longevity	[71] [71]
	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND	[26,47,58,63,65–68,70]
		Blood Blood	Lower in ALS patients than controls Rising levels associated with disease progression	[72] [26]
IL-7	Patients	CSF	Higher in ALS patients than in OND	[60,64]
IL-8	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND	[26,57,63,65,66,68,70]
IL-9	Patients	CSF	Higher in ALS patients than in OND	[60]

Table 1. Cont.

Cytokine	Subject	Biofluid	Significance	Reference
IL-10	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice	[71]
	Patients	Blood	Higher in ALS patients than controls	[26,67]
		CSF, blood	Lower in ALS patients than controls and/or OND	[58,72]
		CSF	Higher levels associated with milder symptoms	[64]
IL-12p70	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND	[26,60]
IL-13	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice	[71]
	Patients	Blood	Higher in ALS patients than controls	[26,56]
Negative correlation with ALSFRS-R score			[56]	
			Positive correlation with the DPR	[56]
IL-15	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND	[58,67,69]
IL-17	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND	[47,58,60,64,67,69]
IL-17A	Patients	Blood	Higher in ALS than controls	[59]
IL-17B R	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice	[71]
			Higher levels associated with shorter survival	[71]
IL-18	Patients	Blood	Higher in ALS patients than controls	[62]
IL-21	Patients	Blood	Higher in ALS patients than controls	[47]

Regarding the potential role of interleukins as prognostic biomarkers, rising levels of IL-4, IL-6 and IL-13 in CSF or blood from ALS patients were associated with disease progression and ALSFRS-R score [26,56,64] (Table 1). Additionally, levels of IL-2 in plasma correlated with poorer survival in both SOD1G93A mice and ALS patients [26,71]. In the animal model SOD1G93A, other interleukins found in plasma, IL-6 and IL-17B R, have been related to faster or slower progression of the disease [71].

Despite the large number of interleukins that seems to participate in the interplay of neuroinflammation in ALS pathogenesis, there is no definitive mediator that is being used in the clinical setting to help in diagnosis or predicting progression.

4.2. Tumor Necrosis Factors

TNF- α is a major pro-inflammatory cytokine. It is primarily secreted by activated macrophages and is involved in the induction of cytokine production, phagocyte cell activation, activation or expression of adhesion molecules, and growth stimulation [75]. In regards to ALS, increased TNF- α levels have been found in CSF and blood from ALS patients [26,60,65,68,69] (Table 2). On the contrary, additional studies have shown lower levels TNF- α in blood from ALS patients [72]. Furthermore, in some cases, TNF- α was not found altered in serum of ALS patients compared to controls [73] or its levels in neither CSF nor blood did not correlate with the severity and progression of the disease [74]. Due to these controversial results, its function in ALS pathogenesis is still uncertain likely due to its pleiotropic actions, as it can act in both pro- and anti-inflammatory responses [76].

Table 2. Tumor necrosis factors (TNF) found dysregulated and proposed as biomarkers in biofluids from ALS animal models and patients.

Cytokine	Subject	Biofluid	Significance	Reference
TNF- α	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND	[26,60,65,68,69]
		Blood	Lower in ALS patients than controls	[72]
TNFRSF1 (CD120)	Patients	Blood	Higher in ALS patients than controls	[68,72]
TNFRSF8 L (CD30 L)	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice	[71]
TNFRSF18 (GITR)	Mouse model	Blood	Lower in TG mice than WT mice	[71]
			Higher levels associated with shorter survival	[71]
TNFRSF19 (TROY)	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice	[71]
			Negative correlation with longevity	[71]
TNFRSF11 (RANKL)	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice	[71]

Although TNF- α is the most studied factor of this family, other TNFs have been found dysregulated in ALS. For instance, blood levels of TNF Receptor Superfamily Member (TNFRSF)1A (CD120) were higher in ALS patients than controls [68,72] (Table 2). In the same line, other TNFs, including TNFRSF8 L, TNFRSF19 and TNF Superfamily Member (TNFSF)11, were elevated, and TNFRSF18 was reduced in the murine model SOD1G93A compared to the levels of WT mice at early stages of the disease [71]. In addition, the prognostic value of some of these factors has been evaluated, resulting in the association of high levels of TNFRSF18 and TNFRSF19 with poorer survival [71].

4.3. Interferons (IFN)

The only circulating IFN found dysregulated in ALS patients to date is IFN- γ . This cytokine takes part in both innate and adaptive immunity by participating in the activation of macrophages and in the adaptive T cell response [28]. In ALS patients, IFN- γ has been found elevated in both CSF and blood compared to the levels measured in controls and OND, and have been associated with faster progression and shorter survival [47,60,67,77] (Table 3). In contrast, other studies suggested lower levels of this factor in CSF and blood from ALS patients [26,58], which questions its role as a potential biomarker for ALS.

Table 3. Interferons (IFN) found dysregulated and proposed as biomarkers in biofluids from ALS patients.

Cytokine	Subject	Biofluid	Significance	Reference
IFN- γ	Patients	CSF, blood	Higher in ALS than controls and/or OND patients	[47,60,67,77]
			Lower in ALS than controls or OND patients	[26,58]
		CSF	Positive correlation with DPR	[67,77]
			Higher levels associated with shorter overall survival.	[67]

4.4. Colony Stimulating Factors (CSFs)

CSFs are responsible for stimulating proliferation and maturation of myeloid precursors. In particular, two of them have been linked to ALS: granulocyte (G)-CSF, involved in granulocyte production, and granulocyte-macrophage (GM)-CSF, participating in granulocyte, monocyte and eosinophil production. Both have been found increased in ALS patients in CSF and blood [58,60,64,67,69] (Table 4). In addition, levels of GM-CSF in blood negatively correlated with the duration of symptoms, which could help in the prognosis of the disease [78]. However, another study reported no significant differences in G-CSF levels in serum between ALS patients and controls or other neuropathies [73].

Table 4. Colony stimulating factors (CSFs) found dysregulated and proposed as biomarkers in biofluids from ALS patients.

Cytokine	Subject	Biofluid	Significance	Reference
G-CSF	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND	[58,60,64,67,69]
GM-CSF	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND	[58,67]
		Blood	Negative correlation with duration of symptoms	[78]

4.5. Chemokines

The main function of pro-inflammatory chemokines is to direct immune cells to the site of inflammation via chemotaxis. As interleukins, this family encloses a vast group of both chemokines and chemokine receptors. Regarding ALS, increased expression of several members of chemokines was found in CSF or blood from ALS patients than in controls or OND: C-C motif chemokine ligand (CCL)2, CCL3, CCL4, CCL11, C-X-C motif chemokine ligand (CXCL)8 and CXCL10; in addition, their levels also correlated with ALSFRS-R score or disease progression rate (DPR) [57,58,60,64,67,69,78–80] (Table 5). In the case of CCL5, higher levels were also found in ALS patients in CSF [61], but not in blood, where its levels, together with CXC5R, were lower than in controls [72].

Table 5. Chemokines found dysregulated and proposed as biomarkers in biofluids from ALS animal models and patients.

Cytokine	Subject	Biofluid	Significance	Reference
CCL2 (MCP-1)	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND Negative correlation with ALSFRS-R score	[57,58,60,67,69,78,80] [60,67]
		Blood	Positive correlation with DPR Negative correlation with duration of symptoms	[67] [78]
CCL3 (MIP-1 α)	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice Negative correlation with longevity	[71] [71]
	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND Positive correlation with disease duration and negative correlation with DPR	[58,67,69,79] [67,79]
CCL4 (MIP-1 β)	Patients	CSF	Higher in ALS patients than controls and OND Positive correlation with ALSFRS-R and disease duration, and negative correlations with DPR	[58,60,67,80] [60]
CCL5 (RANTES)	Patients	CSF	Higher in ALS patients than in OND	[60]
		Blood	Lower in ALS patients than controls	[72]
CCL11 (Eotaxin-1)	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice Higher levels associated with shorter survival and negative correlation with longevity	[71] [71]
	Patients	CSF, blood CSF	Higher in ALS patients than in OND Higher levels with slower DPR	[57,60,64] [64]
CCL19 (MIP-3 β)	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice	[71]
CCL21 (6Ckine)	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice	[71]
CXC5R	Patients	Blood	Lower in ALS patients than controls	[72]
CXCL8	Patients	CSF	Higher in ALS patients than in OND	[60]
			Negative correlation with ALSFRS-R score	[60]
CXCL10	Patients	CSF	Higher in ALS patients than in OND Negative correlation with DPR	[60] [60]

Similarly in the SOD1G93A model, four chemokines were upregulated at early stages in TG mice, CCL3, CCL11, CCL19 and CCL21, suggesting a dysregulation of these mediators before the onset of symptoms [71] (Table 5). In addition, CCL3 and CCL11 negatively correlated with the longevity of TG mice.

4.6. Other Cytokines and Proteins Related to Inflammation

Other proteins related to inflammation have been linked to ALS pathogenesis showing modified levels between ALS patients and their controls, and during disease progression (Table 6). Basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet-derived growth factor (PDGF)-BB were found elevated in CSF or blood in ALS patients [58,64,67]. On the contrary, other studies reported an association of high levels of bFGF with slower progression of the disease, which could be contradictory [67].

In the case of vascular endothelial growth factor (VEGF), higher levels were described in blood and CSF from ALS patients than in controls, whereas positive correlation with ALSFRS-R score and disease duration was reported, supporting the potential role of VEGF for ALS prognosis [58,60,67–69,81]. Low levels were also found in CSF from ALS patients during the first year of the disease [82]. In addition, an analysis combining VEGF with pNFH suggested a higher diagnostic yield [83].

Another cytokine altered in ALS is transforming growth factor beta (TGF- β), which is enrolled in the inhibition of T and B cell proliferation, hematopoiesis, and promotion of wound healing. In this case, higher levels were associated with faster progression of the disease in an ALS mouse model [84]. However, no differences were found in TGF- β levels in plasma from ALS patients [72].

Other proteins have also been shown to be altered in the SOD1G93A mouse model: activin receptor-like kinase (ALK)-1, galectin-1 and VEGF-D were elevated in plasma of TG mice [71]. In addition, rising levels of ALK-1 and galectin-1 in TG mice were associated with shorter survival [71]. In contrast, lower levels of galectin-3 in plasma were found in fast-progressing TG mice [84].

Interestingly, immunoglobulin G (IgG) antibodies have shown a relevant role for ALS prognosis. For instance, it has been reported that frequency and quantity of an IgG glycan is dependent on the ALS clinical stage in ALS animal models [85]. On the other hand, an increase in CSF IgG of the level of galactosylated structures was reported in ALS patients, showing a potential predictive value in the ROC analysis [86].

Table 6. Other cytokines and proteins related to inflammation found dysregulated and proposed as biomarkers in biofluids from ALS animal models and patients.

Protein	Subject	Biofluid	Significance	Reference
ALK-1	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice Higher levels associated with shorter survival	[71] [71]
bFGF	Patients	CSF, blood	Higher in ALS patients than controls and/or OND Positive correlation with disease duration	[58,64,67] [67]
		Blood	Negative correlation with DPR	[67]
Galectin-1	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice Higher levels associated with shorter survival and negative correlation with longevity	[71] [71]
Galectin-3	Mouse model	Blood	Lower in fast-progressing TG mice at pre-symptomatic and symptomatic than in WT mice	[84]
IgG	Patients	CSF	Increased level of galactosylated structures	[86]
PDGF-BB	Patients	CSF	Higher in ALS patients than in OND	[64]
TGF- β	Mouse model	Blood	Higher in slow-progressing TG mice and lower in fast-progressing TG mice at pre-symptomatic and symptomatic than in WT mice	[84]
VEGF	Patients	CSF	Low levels at early stages of ALS Higher in ALS patients than controls and/or OND	[82] [58,60,67–69]
		CSF, blood	Positive correlation with ALSFRS-R score and disease duration Negative correlation with DPR	[60,67,81] [81]
VEGF-D	Mouse model	Blood	Higher in TG mice than WT mice	[71]

5. Cytokines as Biomarkers: Main Challenges

Over the last decades, many CSF and blood inflammatory cytokines have been found dysregulated in ALS, supporting the relevant contribution of neuroinflammation in the pathogenic mechanisms leading to motor neuron degeneration in ALS. However, the results shown are not always consistent in all the studies performed, which hampers the translation of a single cytokine as a biomarker to the clinical practice. As an example, it has been reported that the levels of certain cytokines in plasma from ALS patients were highly variable between the first and the second visit to the clinic, and even they did not show differences with healthy controls in some cases [63], exposing the great heterogeneity of the disease. In an attempt to deal with this issue, some authors have proposed that it would be more appropriate to identify panels of biomarkers, rather than focusing on a single target [87,88]. In this sense, panels of cytokines have been analyzed to help in a more accurate prediction of disease progression [89,90]. However, some authors suggest that these promising multivariate models should also include other clinical parameters, such as ALS type (sporadic or familial), disease stage, anatomical onset of motor neuron impairment and even age and gender [26,91].

Another problem that appears in the searching of circulating cytokines as biomarkers is the influence exerted by the action of environment and other factors surrounding the patient. For instance, the upregulation of some circulating cytokines, such as IL-6, IL-8, IL-10, G-CSF and TNF- α , has been linked to exercise [92], and others, including IL-6 and TNF- α , are elevated in a hypoxia status [93], which is a feature frequently found in ALS patients. In addition, the cytokine levels measured in blood in healthy individuals are not stable markers [94]. Cytokines play a relevant role in the immune system, and alterations in this system due to infections, injuries, tissue trauma or inflammation, which is inherent in ALS, can unbalance the immune system, even more under neurodegenerative conditions. This imbalance can promote an intra-individual variation that could explain the high

variability of cytokine levels observed in ALS [40,94]. Furthermore, in the context of ALS and FTD, the cytokine profile in blood is also challenging to interpret due to the disease state, environmental factors, and genetic background of the individuals that can lead to controversial results [40].

Therefore, the consideration of circulating cytokines and other circulating targets as biomarkers is being increasingly questioned, mainly due to the opposing and irreproducible results that have been shown in different studies [95]. Additionally, the underlying causes, such as lack of sensitivity, unsuitable normalization or variations in sample handling, together with the difficulties in cytokine assays that are not performed in routine clinical methodology, establish this issue as a real challenge. In an attempt to address this problem, Otto et al. proposed a roadmap for biomarker discovery and provided standard operating procedures that could allow multicenter collaboration and validation of the neurochemical markers discovered in ALS to facilitate their translation to the clinic [96]. In this line, multicenter studies can also shed light on this controversial issue by confirming the results among different centers in the world, as demonstrated in several multicenter studies performed with ALS patients [97–99]. Accordingly, it could be interesting to contemplate multicenter studies regarding the most promising inflammatory mediators, which could be helpful to validate them.

6. Design of Therapeutic Approaches Targeting Inflammation

Given the number of cytokines found dysregulated in ALS, in the last decades many studies have translated the focus in assessing the potential role of those cytokines in therapies counteracting inflammation in ALS. In fact, there are currently several clinical trials involving therapies targeting neuroinflammation in ALS [42]. G-CSF is one of the targets that have provided beneficial results when administrated in both animal models and patients [100–102]. Similarly, other studies have shown that the administration of IL-33 or IFN- γ antibody delayed the disease onset and the motor decline, respectively, in an ALS mouse model [103,104]. However, there are also controversial results when translating the findings obtained in the animal model to ALS patients. For example, therapies using thalidomide and lenalidomide to inactivate TNF- α prolonged lifespan and enhanced the motor performance in the animal model [105,106]; in contrast, thalidomide treatment did not cause any improvement when administrated to ALS patients [107]. Regarding IL-6, transgenic mice deficient in IL-6 did not show any improvement, as well as a blocking IL-6 therapy in an ALS mouse model [108,109]. In view of this, it seems evident that therapies targeting a single factor could not provide meaningful benefits in ALS patients, as well as in the search for a reliable biomarker. Hooten et al. address questions on why these kinds of therapies are failing, highlighting that it could be too late when they are applied, or that therapies might not hit appropriate targets [45].

Recently, cell-based therapies are emerging as a promising strategy to modulate the immune system in ALS as they can influence different key immune targets. For instance, experimental treatments based on mesenchymal stem cells (MSCs) have shown to raise concentrations of neurotrophic factors, and elevate anti-inflammatory cytokines, which reduces neuroinflammation [43,110]. On the other hand, therapies targeting Treg, which were associated with disease progression [27,111], have also shown interesting results in ALS patients [112].

7. Conclusions

ALS is a multifactorial disease where different pathological mechanisms direct or indirectly contribute to the degeneration of motor neurons. Neuroinflammation is one of these mechanisms investigated, since the involvement of many inflammatory mediators in this disease has been widely reported. However, the identification of specific cytokines to help in the diagnosis and also to predict the progression of the disease in ALS patients is challenging due to the great heterogeneity found in this disease. In addition, cytokines are variable and susceptible to the disease stage and to environmental factors surrounding ALS patients, who do not show an equal status of neuroinflammation. Consequently, the different pro and anti-inflammatory cytokines along the disease progression should be further studied to understand its time point activation and its relation to

other molecular and clinical mediators in ALS to finally provide a better monitorization of disease progression. In this sense, cytokines could be helpful in improving the stratification of ALS patients according to their inflammatory status, enabling more accurate therapeutic approaches targeting these key immune factors.

Author Contributions: Conceptualization, A.C.C., L.M.-M., M.M. and R.O.; investigation, A.C.C., L.M.-M.; resources, A.C.C., L.M.-M.; writing—original draft preparation, L.M.-M.; writing—review and editing, A.C.C. and R.O.; visualization, A.C.C., M.J.M. and R.O.; supervision, A.C.C., M.J.M. and R.O.; project administration, A.C.C. and R.O.; funding acquisition, A.C.C. and R.O.

Funding: This research was funded by Instituto de Salud Carlos III (Grant PI17/00949) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” from the European Union, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-612), Fundación FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras), Consolidated Groups from Gobierno de Aragón, Fundación Sesé and Plataforma afectados por la ELA. L.M.-M. is supported by Departamento de Industria e Innovación from Gobierno de Aragón and Fondo Social Europeo.

Acknowledgments: We acknowledge Instituto de Salud Carlos III, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” from the European Union, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Fundación FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras), Consolidated Groups from Gobierno de Aragón, Fondo Social Europeo, Fundación Sesé and Plataforma afectados por la ELA for their funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ALK-1	Activin receptor-like kinase 1
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
ALSFRS-R	Amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale-revised
bFGF	Basic fibroblast growth factor
C9ORF72	Chromosome 9 open reading frame 72
CCL	C-C motif chemokine ligand
CSF	Cerebrospinal fluid
CSFs	Colony stimulating factors
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
CXC5R	C-X-C motif chemokine receptor 5
DPR	Disease progression rate
DTI	Diffusion tensor imaging
FUS	Fused in sarcoma
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
IL	Interleukin
IFN	Interferons
IgG	Immunoglobulin G
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
miRNAs	microRNAs
MIP	Macrophage inflammatory protein
MN(s)	Motor neuron(s)
MRI	Magnetic resonance imaging
MRS	Magnetic resonance spectroscopy
NFs	Neurofilaments
NFH	Neurofilament heavy chain
NFL	Neurofilament light chain
OND	Other non-inflammatory neurological disorders
p75 ^{ECD}	Extracellular domain of p75 neurotrophin receptor
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor BB

PET	Positron emission tomography
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
ROS	Reactive oxygen species
SOD1	Superoxide dismutase 1
TDP-43	TAR DNA binding protein 43
TGF- β	Transforming growth factor beta
TG	Transgenic
Th	T helper
TMS	Transcranial magnetic stimulation
TNF	Tumor necrosis factor
TNFRSF	TNF receptor superfamily member
TNFSF	TNF superfamily member
Treg	Regulatory T cell
TROY	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wildtype

References

- Martin, S.; Al Khleifat, A.; Al-Chalabi, A. What causes amyotrophic lateral sclerosis? *F1000Res* **2017**, *6*, 371. [[CrossRef](#)]
- 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. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **1994**, *264*, 1772–1775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Al-Chalabi, A.; Hardiman, O.; Kiernan, M.C.; Chio, A.; Rix-Brooks, B.; van den Berg, L.H. Amyotrophic lateral sclerosis: Moving towards a new classification system. *Lancet Neurol.* **2016**, *15*, 1182–1194. [[CrossRef](#)]
- Cedarbaum, J.M.; Stambler, N.; Malta, E.; Fuller, C.; Hilt, D.; Thurmond, B.; Nakanishi, A. The ALSFRS-R: A revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J. Neurol. Sci.* **1999**, *169*, 13–21. [[CrossRef](#)]
- Turner, M.R.; Hardiman, O.; Benatar, M.; Brooks, B.R.; Chio, A.; de Carvalho, M.; Ince, P.G.; Lin, C.; Miller, R.G.; Mitsumoto, H.; et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 310–322. [[CrossRef](#)]
- Turner, M.R.; Kiernan, M.C.; Leigh, P.N.; Talbot, K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* **2009**, *8*, 94–109. [[CrossRef](#)]
- Verber, N.S.; Sheppard, S.R.; Sassani, M.; McDonough, H.E.; Moore, S.A.; Alix, J.J.P.; Wilkinson, I.D.; Jenkins, T.M.; Shaw, P.J. Biomarkers in Motor Neuron Disease: A State of the Art Review. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 291. [[CrossRef](#)]
- Menke, R.A.; Agosta, F.; Grosskreutz, J.; Filippi, M.; Turner, M.R. Neuroimaging Endpoints in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 11–23. [[CrossRef](#)]
- Mazon, M.; Vazquez Costa, J.F.; Ten-Esteve, A.; Marti-Bonmati, L. Imaging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Neurodegenerative Diseases. The Example of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 784. [[CrossRef](#)]
- Simon, N.G.; Turner, M.R.; Vucic, S.; Al-Chalabi, A.; Shefner, J.; Lomen-Hoerth, C.; Kiernan, M.C. Quantifying disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **2014**, *76*, 643–657. [[CrossRef](#)]
- Ferraro, P.M.; Agosta, F.; Riva, N.; Copetti, M.; Spinelli, E.G.; Falzone, Y.; Soraru, G.; Comi, G.; Chio, A.; Filippi, M. Multimodal structural MRI in the diagnosis of motor neuron diseases. *Neuroimage Clin.* **2017**, *16*, 240–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Barritt, A.W.; Gabel, M.C.; Cercignani, M.; Leigh, P.N. Emerging Magnetic Resonance Imaging Techniques and Analysis Methods in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Neurol.* **2018**, *9*, 1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Steinbach, R.; Gaur, N.; Stubendorff, B.; Witte, O.W.; Grosskreutz, J. Developing a Neuroimaging Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Multi-Center Data Sharing and the Road to a “Global Cohort”. *Front. Neurol.* **2018**, *9*, 1055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Huynh, W.; Dharmadasa, T.; Vucic, S.; Kiernan, M.C. Functional Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Neurol.* **2019**, *9*, 1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Vucic, S.; Rutkove, S.B. Neurophysiological biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* **2018**, *31*, 640–647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Martinez-Paya, J.J.; Rios-Diaz, J.; Medina-Mirapeix, F.; Vazquez-Costa, J.F.; Del Bano-Aledo, M.E. Monitoring Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis Using Ultrasound Morpho-Textural Muscle Biomarkers: A Pilot Study. *Ultrasound Med. Biol.* **2018**, *44*, 102–109. [[CrossRef](#)]
17. Rios-Diaz, J.; Del Bano-Aledo, M.E.; Tembl-Ferrairo, J.I.; Chumillas, M.J.; Vazquez-Costa, J.F.; Martinez-Paya, J.J. Quantitative neuromuscular ultrasound analysis as biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. Radiol.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tarasiuk, J.; Kulakowska, A.; Drozdowski, W.; Kornhuber, J.; Lewczuk, P. CSF markers in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neural Transm. (Vienna)* **2012**, *119*, 747–757. [[CrossRef](#)]
19. Vu, L.T.; Bowser, R. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 119–134. [[CrossRef](#)]
20. Majumder, V.; Gregory, J.M.; Barria, M.A.; Green, A.; Pal, S. TDP-43 as a potential biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol.* **2018**, *18*, 90. [[CrossRef](#)]
21. Bjornevik, K.; Zhang, Z.; O'Reilly, E.J.; Berry, J.D.; Clish, C.B.; Deik, A.; Jeanfavre, S.; Kato, I.; Kelly, R.S.; Kolonel, L.N.; et al. Prediagnostic plasma metabolomics and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Calvo, A.C.; Atencia Cibreiro, G.; Torre Merino, P.; Roy, J.F.; Galiana, A.; Juárez Rufián, A.; Cano, J.M.; Martín, M.A.; Moreno, L.; Larrodé, P.; et al. Collagen XIX Alpha 1 Improves Prognosis in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Aging Dis.* **2019**, *10*, 278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Costa, J.; de Carvalho, M. Emerging molecular biomarker targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Chim. Acta* **2016**, *455*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Floeter, M.K.; Gendron, T.F. Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Associated With Hexanucleotide Expansion Mutations in C9orf72. *Front. Neurol.* **2018**, *9*, 1063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Xu, Z.; Henderson, R.D.; David, M.; McCombe, P.A. Neurofilaments as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lu, C.H.; Allen, K.; Oei, F.; Leoni, E.; Kuhle, J.; Tree, T.; Fratta, P.; Sharma, N.; Sidle, K.; Howard, R.; et al. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2016**, *3*, e244. [[CrossRef](#)]
27. Beers, D.R.; Zhao, W.; Wang, J.; Zhang, X.; Wen, S.; Neal, D.; Thonhoff, J.R.; Alsuliman, A.S.; Shpall, E.J.; Rezvani, K.; et al. ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight* **2017**, *2*, e89530. [[CrossRef](#)]
28. Michaelson, N.; Facciponte, D.; Bradley, W.; Stommel, E. Cytokine expression levels in ALS: A potential link between inflammation and BMAA-triggered protein misfolding. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2017**, *37*, 81–88. [[CrossRef](#)]
29. Blasco, H.; Patin, F.; Madji Hounoum, B.; Gordon, P.H.; Vourc'h, P.; Andres, C.R.; Corcia, P. Metabolomics in amyotrophic lateral sclerosis: How far can it take us? *Eur. J. Neurol.* **2016**, *23*, 447–454. [[CrossRef](#)]
30. Lanznaster, D.; de Assis, D.R.; Corcia, P.; Pradat, P.F.; Blasco, H. Metabolomics Biomarkers: A Strategy Toward Therapeutics Improvement in ALS. *Front. Neurol.* **2018**, *9*, 1126. [[CrossRef](#)]
31. Andreadou, E.; Kapaki, E.; Kokotis, P.; Paraskevas, G.P.; Katsaros, N.; Libitaki, G.; Zis, V.; Sfagos, C.; Vassilopoulos, D. Plasma glutamate and glycine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: The effect of riluzole treatment. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2008**, *110*, 222–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lawton, K.A.; Brown, M.V.; Alexander, D.; Li, Z.; Wulff, J.E.; Lawson, R.; Jaffa, M.; Milburn, M.V.; Ryals, J.A.; Bowser, R.; et al. Northeast ALS Consortium Plasma metabolomic biomarker panel to distinguish patients with amyotrophic lateral sclerosis from disease mimics. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* **2014**, *15*, 362–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Niebroj-Dobosz, I.; Janik, P.; Kwiecinski, H. Effect of Riluzole on serum amino acids in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **2002**, *106*, 39–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bozik, M.E.; Mitsumoto, H.; Brooks, B.R.; Rudnicki, S.A.; Moore, D.H.; Zhang, B.; Ludolph, A.; Cudkowicz, M.E.; van den Berg, L.H.; Mather, J.; et al. A post hoc analysis of subgroup outcomes and creatinine in the phase III clinical trial (EMPOWER) of dexamipexole in ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* **2014**, *15*, 406–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Toivonen, J.M.; Manzano, R.; Olivan, S.; Zaragoza, P.; Garcia-Redondo, A.; Osta, R. MicroRNA-206: A potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e89065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Benigni, M.; Ricci, C.; Jones, A.R.; Giannini, F.; Al-Chalabi, A.; Battistini, S. Identification of miRNAs as Potential Biomarkers in Cerebrospinal Fluid from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Neuromolecular Med.* **2016**, *18*, 551–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ricci, C.; Marzocchi, C.; Battistini, S. MicroRNAs as Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells* **2018**, *7*, 219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Joilin, G.; Leigh, P.N.; Newbury, S.F.; Hafezparast, M. An Overview of MicroRNAs as Biomarkers of ALS. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 186. [[CrossRef](#)]
39. Shephard, S.R.; Wu, J.; Cardoso, M.; Wiklendt, L.; Dinning, P.G.; Chataway, T.; Schultz, D.; Benatar, M.; Rogers, M.L. Urinary p75(ECD): A prognostic, disease progression, and pharmacodynamic biomarker in ALS. *Neurology* **2017**, *88*, 1137–1143. [[CrossRef](#)]
40. McCauley, M.E.; Baloh, R.H. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol.* **2018**. [[CrossRef](#)]
41. Ransohoff, R.M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* **2016**, *353*, 777–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Liu, J.; Wang, F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Beers, D.R.; Appel, S.H. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: Mechanisms and emerging therapies. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 211–220. [[CrossRef](#)]
44. Zhao, W.; Beers, D.R.; Appel, S.H. Immune-mediated mechanisms in the pathoproduction of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2013**, *8*, 888–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hooten, K.G.; Beers, D.R.; Zhao, W.; Appel, S.H. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **2015**, *12*, 364–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Murdock, B.J.; Bender, D.E.; Segal, B.M.; Feldman, E.L. The dual roles of immunity in ALS: Injury overrides protection. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *77*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Saresella, M.; Piancone, F.; Tortorella, P.; Marventano, I.; Gatti, A.; Caputo, D.; Lunetta, C.; Corbo, M.; Rovaris, M.; Clerici, M. T helper-17 activation dominates the immunologic milieu of both amyotrophic lateral sclerosis and progressive multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* **2013**, *148*, 79–88. [[CrossRef](#)]
48. 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. Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 64–79. [[CrossRef](#)]
49. Beers, D.R.; Henkel, J.S.; Zhao, W.; Wang, J.; Huang, A.; Wen, S.; Liao, B.; Appel, S.H. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **2011**, *134*, 1293–1314. [[CrossRef](#)]
50. Zondler, L.; Muller, K.; Khalaji, S.; Bliednerhauser, C.; Ruf, W.P.; Grozdanov, V.; Thiemann, M.; Fundel-Clemes, K.; Freischmidt, A.; Holzmann, K.; et al. Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. *Acta Neuropathol.* **2016**, *132*, 391–411. [[CrossRef](#)]
51. Gasco, S.; Zaragoza, P.; Garcia-Redondo, A.; Calvo, A.C.; Osta, R. Inflammatory and non-inflammatory monocytes as novel prognostic biomarkers of survival in SOD1G93A mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kjaeldgaard, A.L.; Pilely, K.; Olsen, K.S.; Pedersen, S.W.; Lauritsen, A.O.; Moller, K.; Garred, P. Amyotrophic lateral sclerosis: The complement and inflammatory hypothesis. *Mol. Immunol.* **2018**, *102*, 14–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Parker, S.E.; Hanton, A.M.; Stefanou, S.N.; Noakes, P.G.; Woodruff, T.M.; Lee, J.D. Revisiting the role of the innate immune complement system in ALS. *Neurobiol. Dis.* **2019**, *127*, 223–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lall, D.; Baloh, R.H. Microglia and C9orf72 in neuroinflammation and ALS and frontotemporal dementia. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127*, 3250–3258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Glass, C.K.; Saijo, K.; Winner, B.; Marchetto, M.C.; Gage, F.H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* **2010**, *140*, 918–934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Shi, N.; Kawano, Y.; Tateishi, T.; Kikuchi, H.; Osoegawa, M.; Ohyagi, Y.; Kira, J. Increased IL-13-producing T cells in ALS: Positive correlations with disease severity and progression rate. *J. Neuroimmunol.* **2007**, *182*, 232–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Kuhle, J.; Lindberg, R.L.; Regeniter, A.; Mehling, M.; Steck, A.J.; Kappos, L.; Czaplinski, A. Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **2009**, *16*, 771–774. [[CrossRef](#)]
58. Mitchell, R.M.; Freeman, W.M.; Randazzo, W.T.; Stephens, H.E.; Beard, J.L.; Simmons, Z.; Connor, J.R. A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **2009**, *72*, 14–19. [[CrossRef](#)]
59. Fiala, M.; Chattopadhyay, M.; La Cava, A.; Tse, E.; Liu, G.; Lourenco, E.; Eskin, A.; Liu, P.T.; Magpantay, L.; Tse, S.; et al. IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. *J. Neuroinflamm.* **2010**, *7*, 76. [[CrossRef](#)]
60. Tateishi, T.; Yamasaki, R.; Tanaka, M.; Matsushita, T.; Kikuchi, H.; Isobe, N.; Ohyagi, Y.; Kira, J. CSF chemokine alterations related to the clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2010**, *222*, 76–81. [[CrossRef](#)]
61. Furukawa, T.; Matsui, N.; Fujita, K.; Miyashiro, A.; Nodera, H.; Izumi, Y.; Shimizu, F.; Miyamoto, K.; Takahashi, Y.; Kanda, T.; et al. Increased proinflammatory cytokines in sera of patients with multifocal motor neuropathy. *J. Neurol. Sci.* **2014**, *346*, 75–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Italiani, P.; Carlesi, C.; Giungato, P.; Puxeddu, I.; Borroni, B.; Bossu, P.; Migliorini, P.; Siciliano, G.; Boraschi, D. Evaluating the levels of interleukin-1 family cytokines in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation* **2014**, *11*, 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Ehrhart, J.; Smith, A.J.; Kuzmin-Nichols, N.; Zesiewicz, T.A.; Jahan, I.; Shytle, R.D.; Kim, S.H.; Sanberg, C.D.; Vu, T.H.; Gooch, C.L.; et al. Humoral factors in ALS patients during disease progression. *J. Neuroinflamm.* **2015**, *12*, 127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Furukawa, T.; Matsui, N.; Fujita, K.; Nodera, H.; Shimizu, F.; Miyamoto, K.; Takahashi, Y.; Kanda, T.; Kusunoki, S.; Izumi, Y.; et al. CSF cytokine profile distinguishes multifocal motor neuropathy from progressive muscular atrophy. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2015**, *2*, e138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Ngo, S.T.; Steyn, F.J.; Huang, L.; Mantovani, S.; Pfluger, C.M.; Woodruff, T.M.; O’Sullivan, J.D.; Henderson, R.D.; McCombe, P.A. Altered expression of metabolic proteins and adipokines in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **2015**, *357*, 22–27. [[CrossRef](#)]
66. Blasco, H.; Garcon, G.; Patin, F.; Veyrat-Durebex, C.; Boyer, J.; Devos, D.; Voure’h, P.; Andres, C.R.; Corcia, P. Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. *Can. J. Neurol. Sci.* **2017**, *44*, 90–95. [[CrossRef](#)]
67. Guo, J.; Yang, X.; Gao, L.; Zang, D. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS. *Brain Behav.* **2017**, *7*, e00637. [[CrossRef](#)]
68. Hu, Y.; Cao, C.; Qin, X.Y.; Yu, Y.; Yuan, J.; Zhao, Y.; Cheng, Y. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis study. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9094. [[CrossRef](#)]
69. Chen, X.; Hu, Y.; Cao, Z.; Liu, Q.; Cheng, Y. Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer’s Disease, Parkinson’s Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2122. [[CrossRef](#)]
70. Prado, L.G.R.; Rocha, N.P.; de Souza, L.C.; Bicalho, I.C.S.; Gomez, R.S.; Vidigal-Lopes, M.; Braz, N.F.T.; Vieira, E.L.M.; Teixeira, A.L. Longitudinal assessment of clinical and inflammatory markers in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **2018**, *394*, 69–74. [[CrossRef](#)]
71. Moreno-Martínez, L.; de la Torre, M.; Toivonen, J.M.; Zaragoza, P.; García-Redondo, A.; Calvo, A.C.; Osta, R. Circulating Cytokines Could Not Be Good Prognostic Biomarkers in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Andres-Benito, P.; Moreno, J.; Dominguez, R.; Aso, E.; Povedano, M.; Ferrer, I. Inflammatory Gene Expression in Whole Peripheral Blood at Early Stages of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Neurol.* **2017**, *8*, 546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Vlam, L.; Stam, M.; de Jager, W.; Cats, E.A.; van den Berg, L.H.; van der Pol, W.L. Cytokine profiles in multifocal motor neuropathy and progressive muscular atrophy. *J. Neuroimmunol.* **2015**, *286*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Martinez-Merino, L.; Iridoy, M.; Galbete, A.; Roldan, M.; Rivero, A.; Acha, B.; Irun, P.; Canosa, C.; Pocovi, M.; Mendioroz, M.; et al. Evaluation of Chitotriosidase and CC-Chemokine Ligand 18 as Biomarkers of Microglia Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener. Dis.* **2018**, *18*, 208–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Turner, M.D.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D.J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 2563–2582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Tortarolo, M.; Lo Coco, D.; Veglianesi, P.; Vallarola, A.; Giordana, M.T.; Marcon, G.; Beghi, E.; Poloni, M.; Strong, M.J.; Iyer, A.M.; et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis, a Multisystem Pathology: Insights into the Role of TNF α . *Mediators Inflamm.* **2017**, *2017*, 2985051. [[CrossRef](#)]
77. Liu, J.; Gao, L.; Zang, D. Elevated Levels of IFN-gamma in CSF and Serum of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136937.
78. Mitchell, R.M.; Simmons, Z.; Beard, J.L.; Stephens, H.E.; Connor, J.R. Plasma biomarkers associated with ALS and their relationship to iron homeostasis. *Muscle Nerve* **2010**, *42*, 95–103. [[CrossRef](#)]
79. Yang, X.; Gao, L.; Wu, X.; Zhang, Y.; Zang, D. Increased levels of MIP-1 α in CSF and serum of ALS. *Acta Neurol. Scand.* **2016**, *134*, 94–100. [[CrossRef](#)]
80. Martinez, H.R.; Escamilla-Ocanas, C.E.; Camara-Lemarro, C.R.; Gonzalez-Garza, M.T.; Moreno-Cuevas, J.; Garcia Sarreon, M.A. Increased cerebrospinal fluid levels of cytokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia* **2017**.
81. Gao, L.; Zhou, S.; Cai, H.; Gong, Z.; Zang, D. VEGF levels in CSF and serum in mild ALS patients. *J. Neurol. Sci.* **2014**, *346*, 216–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Devos, D.; Moreau, C.; Lassalle, P.; Perez, T.; De Seze, J.; Brunaud-Danel, V.; Destee, A.; Tonnel, A.B.; Just, N. Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients. *Neurology* **2004**, *62*, 2127–2129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Goncalves, M.; De Carvalho, M.; Peixoto, C.; Alves, P.; Barreto, C.; Oliva, A.; Pinto, S.; Laborinho-Pronto, A.; Gromicho, M.; Costa, J. Phosphoneurofilament heavy chain and vascular endothelial growth factor as cerebrospinal fluid biomarkers for ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* **2017**, *18*, 134–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Zubiri, I.; Lombardi, V.; Bremang, M.; Mitra, V.; Nardo, G.; Adiutori, R.; Lu, C.H.; Leoni, E.; Yip, P.; Yildiz, O.; et al. Tissue-enhanced plasma proteomic analysis for disease stratification in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener* **2018**, *13*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Edri-Brami, M.; Sharoni, H.; Hayoun, D.; Skutelsky, L.; Nemirovsky, A.; Porgador, A.; Lichtenstein, R.G. Development of stage-dependent glycans on the Fc domains of IgG antibodies of ALS animals. *Exp. Neurol.* **2015**, *267*, 95–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Costa, J.; Streich, L.; Pinto, S.; Pronto-Laborinho, A.; Nimtz, M.; Conradt, H.S.; de Carvalho, M. Exploring Cerebrospinal Fluid IgG N-Glycosylation as Potential Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol. Neurobiol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
87. von Neuhoff, N.; Oumeraci, T.; Wolf, T.; Kollewe, K.; Beverunge, P.; Neumann, B.; Brors, B.; Bufler, J.; Wurster, U.; Schlegelberger, B.; et al. Monitoring CSF proteome alterations in amyotrophic lateral sclerosis: Obstacles and perspectives in translating a novel marker panel to the clinic. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44401. [[CrossRef](#)]
88. Robelin, L.; Gonzalez De Aguilar, J.L. Blood biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: Myth or reality? *Bioméd. Res. Int.* **2014**, *2014*, 525097. [[CrossRef](#)]
89. Su, X.W.; Simmons, Z.; Mitchell, R.M.; Kong, L.; Stephens, H.E.; Connor, J.R. Biomarker-based predictive models for prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol.* **2013**, *70*, 1505–1511. [[CrossRef](#)]
90. Martinez, H.R.; Escamilla-Ocanas, C.E.; Tenorio-Pedraza, J.M.; Gomez-Almaguer, D.; Jaime-Perez, J.C.; Olguin-Ramirez, L.A.; Salazar-Marioni, S.; Gonzalez-Garza, M.T. Altered CSF cytokine network in amyotrophic lateral sclerosis patients: A pathway-based statistical analysis. *Cytokine* **2017**, *90*, 1–5. [[CrossRef](#)]
91. Garbuzova-Davis, S.; Ehrhart, J.; Sanberg, P.R.; Borlongan, C.V. Potential Role of Humoral IL-6 Cytokine in Mediating Pro-Inflammatory Endothelial Cell Response in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Peake, J.M.; Della Gatta, P.; Suzuki, K.; Nieman, D.C. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: Regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc. Immunol. Rev.* **2015**, *21*, 8–25. [[PubMed](#)]
93. Moreau, C.; Devos, D.; Brunaud-Danel, V.; Defebvre, L.; Perez, T.; Destee, A.; Tonnel, A.B.; Lassalle, P.; Just, N. Elevated IL-6 and TNF- α levels in patients with ALS: Inflammation or hypoxia? *Neurology* **2005**, *65*, 1958–1960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Selmaoui, B.; Sackett-Lundeen, L.; Haus, E.; Touitou, Y. Large intra-individual variability of plasma cytokines in healthy young men: A two 24-h study over a month. *Biol. Rhythm Res.* **2016**, *47*, 267–273. [[CrossRef](#)]

95. Barschke, P.; Oeckl, P.; Steinacker, P.; Ludolph, A.; Otto, M. Proteomic studies in the discovery of cerebrospinal fluid biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev. Proteomics* **2017**, *14*, 769–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Otto, M.; Bowser, R.; Turner, M.; Berry, J.; Brettschneider, J.; Connor, J.; Costa, J.; Cudkowicz, M.; Glass, J.; Jahn, O.; et al. Volcano Group Roadmap and standard operating procedures for biobanking and discovery of neurochemical markers in ALS. *Amyotroph. Lateral Scler.* **2012**, *13*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Mitsumoto, H.; Factor-Litvak, P.; Andrews, H.; Goetz, R.R.; Andrews, L.; Rabkin, J.G.; McElhiney, M.; Nieves, J.; Santella, R.M.; Murphy, J.; et al. ALS COSMOS Study Group ALS Multicenter Cohort Study of Oxidative Stress (ALS COSMOS): Study methodology, recruitment, and baseline demographic and disease characteristics. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* **2014**, *15*, 192–203. [[CrossRef](#)]
98. Calvo, A.; Moglia, C.; Lunetta, C.; Marinou, K.; Ticozzi, N.; Ferrante, G.D.; Scialo, C.; Soraru, G.; Trojsi, F.; Conte, A.; et al. Factors predicting survival in ALS: A multicenter Italian study. *J. Neurol.* **2017**, *264*, 54–63. [[CrossRef](#)]
99. D’hulst, L.; Van Weehaeghe, D.; Chio, A.; Calvo, A.; Moglia, C.; Canosa, A.; Cistaro, A.; Willekens, S.M.; De Vocht, J.; Van Damme, P.; et al. Multicenter validation of [(18)F]-FDG PET and support-vector machine discriminant analysis in automatically classifying patients with amyotrophic lateral sclerosis versus controls. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* **2018**, *19*, 570–577. [[CrossRef](#)]
100. Pollari, E.; Savchenko, E.; Jaronen, M.; Kanninen, K.; Malm, T.; Wojciechowski, S.; Ahtoniemi, T.; Goldsteins, G.; Giniatullina, R.; Giniatullin, R.; et al. Granulocyte colony stimulating factor attenuates inflammation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflamm.* **2011**, *8*, 74. [[CrossRef](#)]
101. Rando, A.; Gasco, S.; de la Torre, M.; Garcia-Redondo, A.; Zaragoza, P.; Toivonen, J.M.; Osta, R. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Ameliorates Skeletal Muscle Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice and Improves Proliferation of SOD1-G93A Myoblasts in vitro. *Neurodegener Dis.* **2017**, *17*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Johannesen, S.; Budeus, B.; Peters, S.; Iberl, S.; Meyer, A.L.; Kammermaier, T.; Wirkert, E.; Bruun, T.H.; Samara, V.C.; Schulte-Mattler, W.; et al. Biomarker Supervised G-CSF (Filgrastim) Response in ALS Patients. *Front. Neurol.* **2018**, *9*, 971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Otsmane, B.; Aebischer, J.; Moumen, A.; Raoul, C. Cerebrospinal fluid-targeted delivery of neutralizing anti-IFN γ antibody delays motor decline in an ALS mouse model. *Neuroreport* **2014**, *25*, 49–54. [[PubMed](#)]
104. Korhonen, P.; Pollari, E.; Kanninen, K.M.; Savchenko, E.; Lehtonen, S.; Wojciechowski, S.; Pomeschchik, Y.; Van Den Bosch, L.; Goldsteins, G.; Koistinaho, J.; et al. Long-term interleukin-33 treatment delays disease onset and alleviates astrocytic activation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *IBRO Rep.* **2019**, *6*, 74–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Kiaei, M.; Petri, S.; Kipiani, K.; Gardian, G.; Choi, D.K.; Chen, J.; Calingasan, N.Y.; Schafer, P.; Muller, G.W.; Stewart, C.; et al. Thalidomide and lenalidomide extend survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 2467–2473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Neymotin, A.; Petri, S.; Calingasan, N.Y.; Wille, E.; Schafer, P.; Stewart, C.; Hensley, K.; Beal, M.F.; Kiaei, M. Lenalidomide (Revlimid) administration at symptom onset is neuroprotective in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **2009**, *220*, 191–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Stommel, E.W.; Cohen, J.A.; Fadul, C.E.; Cogbill, C.H.; Graber, D.J.; Kingman, L.; Mackenzie, T.; Channon Smith, J.Y.; Harris, B.T. Efficacy of thalidomide for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: a phase II open label clinical trial. *Amyotroph Lateral Scler.* **2009**, *10*, 393–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Han, Y.; Ripley, B.; Serada, S.; Naka, T.; Fujimoto, M. Interleukin-6 Deficiency Does Not Affect Motor Neuron Disease Caused by Superoxide Dismutase 1 Mutation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Patin, F.; Baranek, T.; Vourc’h, P.; Nadal-Desbarats, L.; Goossens, J.F.; Marouillat, S.; Dessen, A.F.; Descat, A.; Hounoum, B.M.; Bruno, C.; et al. Combined Metabolomics and Transcriptomics Approaches to Assess the IL-6 Blockade as a Therapeutic of ALS: Deleterious Alteration of Lipid Metabolism. *Neurotherapeutics* **2016**, *13*, 905–917. [[CrossRef](#)]
110. Kim, S.H.; Oh, K.W.; Jin, H.K.; Bae, J.S. Immune inflammatory modulation as a potential therapeutic strategy of stem cell therapy for ALS and neurodegenerative diseases. *BMB Rep.* **2018**, *51*, 545–546. [[CrossRef](#)]

111. 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.; et al. Association of Regulatory T-Cell Expansion With Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Study of Humans and a Transgenic Mouse Model. *JAMA Neurol.* **2018**, *75*, 681–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Thonhoff, J.R.; Beers, D.R.; Zhao, W.; Pleitez, M.; Simpson, E.P.; Berry, J.D.; Cudkowicz, M.E.; Appel, S.H. Expanded autologous regulatory T-lymphocyte infusions in ALS: A phase I, first-in-human study. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2018**, *5*, e465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ABREVIATURAS

9

A

ACTB	Beta actina
ALK-1	Kinasa similar al receptor de activina 1
ALSFRS-R	Amotrophic lateral sclerosis functional rating scale-revised
ALS2	Alsin rho guanine nucleotide exchange Factor ALS2
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANG	Angiogenin
APS	Ammonium persulfate
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein
ATP	Adenosín trifosfato
ATXN2	Ataxin 2

B

BCA	Ácido bicinconínico
-----	---------------------

C

CCL21 o 6CKine	Quimioquina 21
CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2B
Cho	Colina
COX-2	Ciclooxygenasa-2
Cr	Creatina
CRP	Proteína C reactiva
cyclo(His-Pro)	Histidyl-proline diketopiperazine
C9orf72	Chromosome 9 open reading frame 72
C21orf2	Chromosome 21 open reading frame 2

D

DAMPs	Damage associated molecular patterns
DCTN	Dynactin
DFT	Demencia frontotemporal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario

E

EAAT2	Excitatory amino acid transporter 2
EDL	Extensor digital largo
EIM	Miografía por impedancia eléctrica
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELAE	Esclerosis lateral amiotrófica esporádica
ELAF	Esclerosis lateral amiotrófica familiar
EMG	Electromiografía
EMT	Estimulación magnética transcraneal

ERM Espectroscopía por resonancia magnética
EWSR1 Ewing sarcoma breakpoint region 1

F

FoxP3 Forkhead box P3
FUS Fused in sarcoma

G

GABA Ácido gamma-aminobutírico
GAPDH Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gata-3 GATA binding protein 3
Gsr Glutathione reductase
gzmA Granzima A

H

hnRNPA1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
hnRNPA2 B1N Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
Hprt Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HRP Horseradish peroxidase
HSC Células madre hematopoyéticas
H₂O_d Agua destilada

I

IFN- γ Interferón gamma
IL Interleuquina
IL-17B R Receptor de la interleuquina 17B
iPSCs Células madre pluripotentes inducidas
IRM Imagen por resonancia magnética
ITD Imagen por tensor de difusión

L

LCR Líquido cefalorraquídeo

M

MATR3 Matrin 3
MCP-1 Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MIP-1 α Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alpha
MIP-3 β Proteína inflamatoria de macrófagos 3 beta

MLKL	Mixed lineage kinase domain-like
MNI	Motoneurona inferior
MNS	Motoneurona superior
MSCs	Células madre mesenquimales
mQ	Milli Q o ultrapura
Mt2	Metallothionein-2
MUNE	Estimación del número de unidades motoras
MUNIX	Índice del número de unidades motoras

N

NAA	N-acetil-aspartato
NaCl	Cloruro sódico
NBP	DI-3-n-butilftalida
NEFH	Neurofilament heavy polypeptide
NEK1	NIMA related kinase 1
NF	Neurofilamentos
NFH	Cadena pesada de neurofilamentos
NFL	Cadena ligera de neurofilamentos
NF-κB	Nuclear factor- kappa B
NLRP3	Nod-like receptor family pyrin domain containing 3
NOX2	NADPH oxidasa 2
NPCs	Células madre neurales de origen de tejido neural

O

ONP	Otras neuropatías
OPTN	Optineurin

P

PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR a tiempo real
RT-PCR	Retrotranscripción
PFH	Punto final humanitario
PFN1	Profilin 1
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
p75ECD	Dominio extracelular del receptor de neurotrofina p75

R

RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RIPK1	Receptor interacting serine/threonine-protein kinase 1
RM	Resonancia magnética
RNA	Ácido ribonucleico

mRNA	RNA mensajero
miRNA	micro-RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno

S

SDS	Dodecilsulfato sódico
SETX	Senataxin
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	Superoxido dismutasa 1
hSOD1	Superoxido dismutasa 1 humana
SOL	Sóleo
SPG11	Spastic paraplegia 11
SQSTM1/p62	Sequestosome-1
SR	Scavenger receptor

T

TAF15	TATA-box binding protein associated factor 15
TARDBP/TDP43	Proteína TAR de unión a DNA/RNA
TBK1	TANK Binding Kinase 1
Tbp	TATA-binding protein
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TEP	Tomografía por emisión de positrones
TGF- β	Factor de crecimiento transformador-beta
Th	T helper
TIA1	T-cell-restricted intracellular antigen-1
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFSF8 o CD30 L	Miembro 8 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral
TNFRSF18 o GITR	Miembro 18 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral
TNFRSF19 o TROY	Miembro 19 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral
Treg	T reguladores
TTBS	Tween-Tris-buffered saline
TTC	Fragmento C-terminal de la toxina tetánica
TUBA4A	Tubulin Alpha 4a

U

UBQLN2	Ubiquilin-2
UNC13A	Unc-13 homolog A

V

VAPB	Vesicle associated membrane protein associated protein B
------	--

VCP Valosin containig protein
VEGF Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGF-D Factor de crecimiento endotelial vascular D

W

WT Wildtype

