The background of the cover is a microscopic image of neurons, showing their cell bodies and long, thin axons extending outwards. The image is rendered in a warm, golden-brown color palette. A large, semi-transparent orange circle is centered on the page, containing the title and author information. At the bottom, there is another semi-transparent orange circle containing the university logo and the date.

**Esclerosis Lateral Amiotrófica:
Investigaciones en el modelo SOD1^{G93A}
y correlaciones de interés clínico**

Marta Cejudo Guillén

Tesis Doctoral



Marzo 2016

"Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.

The important thing is not to stop questioning."

Albert Einstein



Universidad de Sevilla – Facultad de Medicina

Tesis Doctoral

Esclerosis Lateral Amiotrófica:
investigaciones en el modelo $SOD1^{G93A}$ y
correlaciones de interés clínico

Marta Cejudo Guillén

Marzo, 2016

Prof. Dr. David Pozo Pérez, Profesor Titular e Investigador Principal de la Universidad de Sevilla y miembro del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), junto a **Profa. Dra. Diana Caballero Hernández** y a **Profa. Dra. Cintia Roodveldt**,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“Esclerosis Lateral Amiotrófica: investigaciones en el modelo SOD1^{G93A} y correlaciones de interés clínico”** presentado por Marta Cejudo Guillén, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizado bajo su supervisión en el laboratorio de Terapias Avanzadas en Neuroprotección e Inmunoregulación del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea defendido ante el tribunal correspondiente.

Y, para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Sevilla a 30 de marzo de 2016,

Prof. Dr. David Pozo Pérez
Director de tesis

Profa. Dra. Diana Caballero Hernández
Codirectora de tesis

Profa. Dra. Cintia Roodveldt
Codirectora de tesis

Marta Cejudo Guillén

ÍNDICE GLOBAL

Índice de contenidos	I
Abreviaturas	XI
Resumen	1
Introducción	5
Objetivos	85
Capítulo 1. EFECTO DE LOS NEUROPEPTIDOS VIP Y NAP EN EL MODELO SOD1 ^{G93A}	89
Capítulo 2. RESPUESTA INMUNITARIA PERIFÉRICA EN ELA	153
Capítulo 3. ESTUDIO METABOLÓMICO SOBRE EL MODELO SOD1 ^{G93A}	191
Referencias	239
Apéndice: Publicaciones	283

ÍNDICE DE CONTENIDOS



RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
I. NEUROINMUNOLOGÍA	7
II. NEUROPEPTIDOS	18
1. Péptido intestinal vasoactivo	19
1.1. Funciones de VIP en el sistema nervioso central: enfermedades neurodegenerativas	22
1.2. Funciones de VIP en el sistema inmunitario	28
1.3. Estudios funcionales in vivo: uso de animales modificados genéticamente	31
2. ADFN/ADNP/NAP	34
2.1. Funciones de NAP en el sistema nervioso central: enfermedades neurodegenerativas	38
III. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)	40
1. Epidemiología y clínica de la ELA	41
2. Diagnóstico de ELA	43
3. Tratamientos en ELA	46
4. Fisiopatología ELA	47
4.1. Excitotoxicidad	50
4.2. Estrés oxidativo	51
4.3. Daño en el transporte axonal	52
4.4. Disfunción mitocondrial	52
4.5. Agregación de proteínas	54
4.6. Desregulación del sistema inmunitario en la ELA: Neuroinflamación	54

4.6.1.	Glía: Astrocitos y microglía	55
4.6.2.	Linfocitos	62
5.	Metabólica en ELA	67
6.	VIP/NAP en ELA	74
7.	Modelos animales en el estudio de la ELA	75
7.1.	Modelo SOD1	76
7.2.	Modelo TDP-43.....	80
7.3.	Modelo FUS	83
7.4.	Otros modelos	84
OBJETIVOS		87

CAPÍTULO 1. EFECTO DE LOS NEUROPEPTIDOS VIP Y NAP EN EL		
MODELO SOD1^{G93A}		89
I.	RESUMEN Y FUNDAMENTO TEÓRICO	91
II.	MATERIAL Y MÉTODOS	95
1.	Animales experimentales	95
1.1.	Colonia de animales SOD1 ^{G93A}	95
1.1.1.	Animales experimentales	95
1.1.2.	Establecimiento y mantenimiento de la colonia ALS	95
1.1.3.	Genotipado de ratones.....	96
1.1.4.	Monitorización del número de copias del transgen.....	97
1.1.5.	Evaluación de la progresión de la enfermedad	97

1.1.6.	Determinación del inicio de la enfermedad	99
1.1.7.	Determinación de la fase terminal (punto final artificial)	99
1.1.8.	Determinación del tiempo de duración de la enfermedad	99
1.2.	Colonia VIPKO	100
1.2.1.	Animales experimentales	100
1.2.2.	Establecimiento y mantenimiento de la colonia VIPKO	100
1.2.3.	Genotipado de ratones knock out para VIP	101
2.	Tratamiento con péptidos neuroprotectores e inmunomoduladores: VIP y NAP	102
2.1.	Intervención pre-sintomática	102
2.1.1.	Inyección intraperitoneal de los neuropéptidos VIP y NAP .	102
2.2.	Intervención sintomática.....	103
2.2.1.	Inyección intraperitoneal de los neuropéptidos VIP y NAP .	103
2.2.2.	Inyección intraperitoneal de células mesenquimales murinas transducidas con el gen de VIP.....	104
3.	Estudio de la biodistribución de células mesenquimales que sobreexpresan VIP	105
3.1.	Grupos experimentales	106
3.2.	Marcaje células mesenquimales	106
3.3.	Administración MSCs y estudio in vivo	107
3.4.	Estudio ex vivo.....	107
4.	Evaluación del papel fisiológico del péptido intestinal vasoactivo en el fenotipo de ratones transgénicos SOD1 ^{G93A}	108
5.	Análisis estadístico	111
III.	RESULTADOS	113

1. Tratamiento con péptidos neuroprotectores e inmunomoduladores: VIP y NAP	113
1.1. Intervención pre-sintomática	113
1.1.1. Inyección intraperitoneal de los neuropéptidos VIP y NAP .	113
1.1.1.a. Monitorización de la evolución de peso	113
1.1.1.b. Evaluación del equilibrio y la coordinación.....	113
1.1.1.c. Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia.....	113
1.2. Intervención sintomática.....	116
1.2.1. Inyección intraperitoneal de los neuropéptidos VIP y NAP .	116
1.2.1.a. Monitorización de la evolución de peso	116
1.2.1.b. Evaluación del equilibrio y la coordinación.....	118
1.2.1.c. Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia.....	118
1.2.2. Efecto de la inyección intraperitoneal de células mesenquimales que sobreexpresan VIP	120
1.2.2.a. Monitorización de la evolución de peso	120
1.2.2.b. Evaluación del equilibrio y la coordinación.....	121
1.2.2.c. Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia.....	123
2. Estudio de biodistribución de células mesenquimales	124
2.1. Estudio in vivo	125
2.2. Estudio ex vivo.....	127
3. Evaluación del papel fisiológico del péptido intestinal vasoactivo en el fenotipo de ratones transgénicos SOD1 ^{G93A}	128
3.1. Hembras	128

3.1.1.	Monitorización de la evolución de peso	129
3.1.2.	Evaluación del equilibrio y la coordinación	131
3.1.3.	Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia	131
3.2.	Machos	134
3.2.1.	Monitorización de la evolución de peso	134
3.2.2.	Evaluación del equilibrio y la coordinación	135
3.2.3.	Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia	135
3.3.	Evolución de la enfermedad en animales SOD1 ^{G93A} defectivos en VIP: estudio de influencia del sexo de los animales.....	136
3.3.1.	Monitorización de la evolución de peso	136
3.3.2.	Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia	136
IV.	DISCUSIÓN.....	141
V.	CONCLUSIONES	151

CAPÍTULO 2. RESPUESTA INMUNITARIA PERIFÉRICA EN ELA.....	153
I. RESUMEN Y FUNDAMENTO TEÓRICO	155
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	159
1. Ligandos de TLRs	159
2. Origen de las muestras: Pacientes con ELA y modelo SOD1 ^{G93A}	160
3. Cultivos celulares: obtención de PBMC humanos y de esplenocitos de ratón	161

4.	Tratamiento con ligandos específicos de TLRs.....	162
5.	Análisis de citoquinas en sobrenadante.....	162
6.	Extracción de ARN y retrotranscripción	163
7.	Determinación de los niveles de expresión de genes TLRs y MyD88 en animales SOD1 ^{G93A} y en PBMC humanos	163
8.	Análisis estadístico	166
III.	RESULTADOS	167
1.	Niveles basales de citoquinas: pacientes con ELA y modelo SOD1 ^{G93A}	167
2.	Caracterización de la respuesta mediada por TLRs en pacientes con ELA.....	169
3.	Caracterización de la respuesta a ligandos de TLRs en animales SOD1 ^{G93A} ...	172
4.	Niveles de expresión génica de TLRs en ELA: pacientes con ELA y animales SOD1 ^{G93A}	177
IV.	DISCUSIÓN.....	181
V.	CONCLUSIONES	185
VI.	MATERIAL SUPLEMENTARIO	187

CAPÍTULO 3. ESTUDIO METABOLÓMICO SOBRE EL MODELO SOD1^{G93A}	191
I. RESUMEN Y FUNDAMENTO TEÓRICO	193
II. MATERIAL Y MÉTODOS	195
1. Adquisición de las muestras para el estudio metabólico en el modelo SOD1 ^{G93A}	195

2. Análisis metabólico cuantitativo mediante espectroscopía de ^1H por resonancia magnética de alta resolución en ángulo mágico (^1H HR-MAS RMN)...	196
2.1. Adquisición de los espectros de disoluciones modelo	196
2.2. Adquisición de los espectros de los extractos de tejido	197
2.3. Análisis cuantitativo	198
3. Análisis estadístico	199
III. RESULTADOS	201
1. Análisis metabolómico: diferencias entre animales SOD1 ^{G93A} y wild-type	201
2. Análisis metabolómico: diferencias en evolución	205
3. Análisis metabolómico: análisis discriminante.....	209
4. Resumen de los análisis de metabolómica	213
IV. DISCUSIÓN	219
V. CONCLUSIONES	231
VI. MATERIAL SUPLEMENTARIO	233
REFERENCIAS	239
APÉNDICE: PUBLICACIONES	283

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

¹H-NMR	Resonancia magnética nuclear de protón
ADNF	<i>Activity-dependent neurotrophic factor</i>
ADNP	<i>Activity-dependent neuroprotective protein</i>
AF-750	Alexa flúor 750 éster de succinimidil
Ala	Alanina
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza de un factor
Asp	Aspartato
Aβ	β -amiloide
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
Bet	Betaína
BHE	Barrera hematoenceférica
C9FTD/ALS	<i>Frontotemporal dementia/amyotrophic lateral sclerosis/Chromosome 9</i>
C9ORF72	<i>Chromosome 9 open reading frame 72</i>
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
cDNA	ADN complementario
Cho	Colina
CPAs	Células presentadoras de antígenos
CpG	Oligodeoxynucleotido con motivos CpG no metilados
Cr	Creatina
Cr+PCr	Creatina + fosfocreatina
CSF-1	Factor estimulante de colonias
CXCL10	Proteína inducible por interferón 10
DAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
DC	Células dendríticas
DFT	Demencia frontotemporal
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Encefalitis autoinmune experimental
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EFNS	Federación Europea de Sociedades Neurológicas

ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	Esclerosis múltiple
EP	Enfermedad de Parkinson
FSL-1	Lipoproteína sintética derivada de <i>Mycoplasma</i>
FUS	<i>Fused in sarcoma</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
Glc	Glucosa
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GPC	Glicerolfosfolina
GSH	Glutati3n
HNRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>
HPRT	Hipoxantina fosforribosiltransferasa
HR-MAS	Resonancia magnética nuclear de alta resoluci3n por ángulo mágico
i.p.	Intraperitoneal
Iba-1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
iFBS	Suero fetal bovino inactivado
IFN	Interfer3n
IL	Interleuquina
Imiq	Imiquimod
KO	<i>Knockout</i>
Lac	Lactato
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Leu	Leucina
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
MC hASCs	Medio condicionado de células mesenquimales adiposas
MC hUCESCs	Medio condicionado de células mesenquimales uterinas
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>

M-CSF	Factor estimulante de colonias
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MND	Enfermedades de la neurona motora
MNI	Motoneurona inferior
MNS	Motoneurona superior
MSCs	Células mesenquimales de médula ósea de ratón
Myo	Mioinositol
NAA	N-acetil aspartato
NAAG	N-acetil aspartil glutamato
NAP	Octapéptido derivado de ADNP
NF-$\kappa\beta$	Factor de transcripción $\kappa\beta$
NLR	Receptor tipo Nod
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	Resonancia magnética nuclear
NO	Óxido nítrico
PAC1	Receptor de PACAP de tipo 1
PACAP	Péptido activador de la adenilil ciclasa pituitaria
Pam3	Lipoproteína bacteriana sintética Pam3Csk4
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
Pcho	Fosfocolina
PGN	Peptidoglicano
Phe	Fenilalanina
PHI	Péptido histidina-isoleucina
PHM	Péptido histidina-metionina
PKA	Proteína kinasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
Poly I:C	Ácido poliinosínico-policitidílico
PRP	Receptores de reconocimiento de patógenos
RLC	Receptor de tipo lectina C
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEM	Error estándar de la media

SI	Sistema inmunitario
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SOD1	Superóxido dismutasa tipo 1
TARDBP	<i>Transactive response DNA binding protein</i>
Tau	Taurina
TDP-43	<i>TAR DNA-binding protein 43</i>
Tg	Transgénico
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
Thr	Treonina
TIR	Receptor Toll/IL-1
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
Treg	Células T reguladoras
UBQLN2	<i>Ubiquilin 2</i>
VAPB	<i>Vessicle associated membrane protein</i>
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VIP -/-	Animales nulos para el gen VIP
VIP +/-	Animales heterocigotos para el gen VIP
VIP +/+	Animales homocigotos para el gen VIP
VPAC	Receptor del péptido intestinal vasoactivo
VPS54	<i>Vacuolar protein sorting 54</i>
Wt	<i>Wild-type/silvestre</i>

RESUMEN



RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa, incurable y carácter fatal en el plazo de 3-5 años desde su diagnóstico. Esta enfermedad se caracteriza por la degeneración progresiva de neuronas motoras. Actualmente se sabe que el sistema nervioso central (SNC) no representa una zona inmunológicamente privilegiada, de hecho cada vez cobra mayor importancia el papel que el sistema inmunitario pudiera tener en la fisiopatología asociada al curso de ciertas enfermedades neurodegenerativas, la ELA sería un ejemplo de ello. Este hecho se hace especialmente evidente debido al componente neuroinflamatorio asociado a esta enfermedad. Hasta la fecha han sido numerosas las evidencias experimentales publicadas en las que se pone de manifiesto la implicación tanto del sistema nervioso como del sistema inmunitario en la ELA.

La respuesta inflamatoria es mediada en gran parte por los receptores de tipo Toll (TLRs), presentes tanto a nivel periférico como a nivel central. Estos receptores son fundamentales en el control inicial de la replicación de agentes patógenos, en el reclutamiento y activación de células del sistema inmunitario adaptativo para su posterior eliminación, y en el reconocimiento de productos derivados del daño tisular. Existen evidencias que demuestran el posible nexo entre infecciones bacterianas/víricas sistémicas y el transcurso de la enfermedad en modelos de ELA. En este sentido se hace interesante explorar la respuesta derivada del estímulo de TLRs en las células inmunitarias periféricas durante el curso de la ELA. Nuestros resultados muestran que existe una desregulación de la respuesta inmunitaria mediada por TLRs en el contexto de esta enfermedad, tanto en el modelo SOD1^{G93A} como en pacientes con ELA. Se observa una reducción general de la respuesta frente a ligandos específicos para TLRs en términos de secreción de citoquinas, IL-6, IFN- γ e IL-10 y un aumento de la respuesta derivada de la estimulación mediada específicamente por TLR-3.

La ELA lleva consigo asociado un importante componente inflamatorio crónico, por ello se hace especialmente interesante el estudio del efecto del neuropéptido VIP como potencial agente terapéutico, debido a la gran capacidad inmunomoduladora asociada a este neuropéptido. En este sentido,

es también de interés explorar el efecto terapéutico de la molécula bioactiva NAP, perteneciente a la proteína ADNP, en el contexto de esta enfermedad. Siendo ADNP una proteína capaz de mediar acciones de VIP. NAP es considerado un potente neuroprotector capaz de evitar la muerte neuronal asociada al bloqueo eléctrico por tetrodotoxina y a la excitotoxicidad por NMDA. Por todo ello decidimos explorar el efecto de la administración exógena de VIP y NAP, tanto desde un punto de vista profiláctico, comenzando en fase pre-sintomática, como terapéutico, comenzando tras el inicio de los primeros síntomas en el modelo. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la terapia con los neuropéptidos VIP y NAP afecta al transcurso del proceso patológico que acontece en el modelo animal SOD1^{G93A}, observamos que el momento de inicio de la enfermedad se adelanta, sin embargo, se reduce la velocidad de avance de la misma. Con el fin de evaluar también el papel que VIP endógeno presentaba en el curso del proceso patológico en el modelo, estudiamos la evolución de la enfermedad en ausencia parcial y completa de VIP endógeno. Los resultados obtenidos muestran que dicho neuropéptido presenta un papel como modulador del proceso patológico asociado a esta enfermedad. La ausencia completa de VIP endógeno hace que se retrase el inicio de la enfermedad, aunque, por otra parte, el curso de la misma es más agresivo una vez iniciada.

En la ELA no existen biomarcadores específicos para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad, debido en parte a la complejidad del proceso fisiopatológico asociado. El metaboloma refleja el fenotipo de un organismo dado y podría constituir una herramienta útil en el estudio de enfermedades de etiología poco conocida. En este sentido, decidimos explorar perfil metabólico de diferentes regiones anatómicas de relevancia en el modelo SOD1^{G93A} con el fin de explorar potenciales biomarcadores asociados a la ELA. Nuestros resultados muestran que el cerebro y la zona cervical de la médula espinal son las regiones donde varía en mayor medida el perfil metabólico durante el transcurso del proceso patológico en el modelo SOD1^{G93A}. Más aún, observamos que el perfil metabólico asociado a las diferentes regiones exploradas permite clasificar en un alto porcentaje a los animales como transgénicos o como animales no portadores del transgen en diferentes fases de progresión de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN



I. NEUROINMUNOLOGÍA

La neuroinmunología engloba dos importantes especialidades, neurociencia e inmunología. Desde el siglo XIX se han identificado enfermedades neuroinmunológicas, si bien desde entonces ha sido difícil describir tanto los mecanismos fisiopatológicos como el método de diagnóstico y el tratamiento asociado a las mismas. Existen mecanismos celulares y moleculares que influyen mutuamente en el sistema nervioso (SN) y el sistema inmunitario (SI). Determinadas células del sistema nervioso son capaces de producir sustancias inmunológicamente activas, como pueden ser las citoquinas, y de actuar como células presentadoras de antígenos (CPAs). Por otra parte, el sistema inmunitario incluye elementos celulares capaces de producir factores neurotróficos y contribuir a los mecanismos de reparación del sistema nervioso tras la lesión tisular. Ambos sistemas comparten receptores celulares para neurotransmisores, quimioquinas y citoquinas. Se han descrito efectos de mediadores neuroendocrinos sobre el SI, y efectos de citoquinas sobre el SN. Todas estas propiedades son parte de la base mecanicista de la neuroinmunología y determinarán la comunicación bidireccional existente entre ambos sistemas (Delgado et al. 2004; Correale et al. 2011).

La inmunología incluye el estudio de los mecanismos fisiológicos que tanto los seres humanos como otras especies emplean para defenderse de la invasión por otros organismos. El conjunto de células, tejidos y órganos que funcionan en equipo para defendernos de agentes externos se conoce como sistema inmunitario, dentro del cual podemos diferenciar entre el sistema inmunitario innato y el adaptativo. Una característica fundamental en el control eficaz de la respuesta inmunitaria es la capacidad de discriminar los componentes propios de los extraños, gracias a una compleja red de circuitos implicados. El sistema inmunitario innato proporciona la primera línea de defensa y es independiente

de exposiciones previas; mientras que, el sistema inmunitario adaptativo proporciona inmunidad duradera gracias al desarrollo de memoria inmunológica, permitiendo de este modo una mayor eficiencia frente a exposiciones antigénicas subsiguientes. La respuesta inmunitaria innata coordina inicialmente el perfil que desarrollará la respuesta inmunitaria adaptativa, siendo ésta última capaz de secretar mediadores que determinarán la activación o el silenciamiento de la respuesta innata.

La naturaleza de la respuesta proporcionada por el sistema inmunitario innato se debe, en su mayoría, a componentes celulares de origen mieloide. Es una respuesta rápida y con características similares frente a estimulaciones por el mismo agente. El reconocimiento de los patógenos se hace mediante la identificación de estructuras moleculares conservadas en un amplio espectro de microorganismos, los cuales se conocen como 'patrones moleculares asociados a patógenos' (PAMP, del inglés *pathogen associated molecular patterns*), y se identifican a través de unos receptores llamados 'receptores de reconocimiento de patógenos' (PRP, del inglés *pattern recognition receptors*), presentes en neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, mastocitos y células dendríticas (DC) (Medzhitov & Janeway Jr. 2002; Akira et al. 2006). El reconocimiento de los PAMPs a través de los PRPs activa vías de señalización intracelulares que culminan en la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, interferones (IFNs) y moléculas coestimuladoras (Medzhitov & Janeway Jr. 2002; Akira et al. 2006). Hasta la fecha, son tres los grupos en los que podemos englobar a estos PRPs: los receptores de lectina tipo C (RLC), los receptores de tipo Nod (NLR, del inglés *Nod-like receptor*) y los receptores de tipo Toll (TLRs) (Iwasaki & Medzhitov 2010; Trinchieri & Sher 2007). Es importante mencionar que la expresión de PRPs no se circunscribe únicamente a células típicas de la inmunidad innata, ya que se sabe que las células B y T

también expresan TLRs. En el año 2007, Zanin-Zhorov y colaboradores, demostraron que a pesar de que el LPS (lipopolisacárido, ligando específico de TLR-4), no afectaba a las células T en términos de proliferación celular y secreción de citoquinas (Sutmuller et al. 2006), esto no significaba que el LPS careciera de efecto sobre dicho tipo celular; de hecho, estos autores demostraron que LPS, vía TLR-4, inducía la adhesión de estas células a la fibronectina e inhibía la quimiotaxis de las células T (Zanin-Zhorov et al. 2007)

Los TLRs son fundamentales en el control inicial de la replicación de agentes patógenos, en el reclutamiento y activación de células del sistema inmunitario adaptativo para su posterior eliminación, y en el reconocimiento de productos derivados del daño tisular; se han identificado hasta 11 productos génicos de TLRs diferentes en mamíferos (Akira et al. 2006; Bauer et al. 2009).

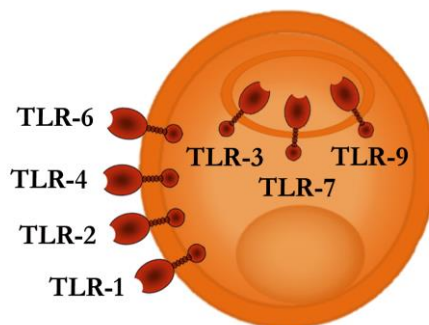


Figura 1. Esquema de receptores de tipo Toll. Receptores de tipo Toll de superficie celular (TLR-1, 2, 4 y 6) y receptores de compartimentos endocíticos (TLR-3, 7, 9).

Estos receptores pueden clasificarse en dos grupos en función de su localización: los receptores de superficie celular (TLR-1, 2, 4 y 6) y los receptores de compartimentos endocíticos (TLR-3, 7, 9) (Figura 1). Los TLRs son proteínas transmembranas con un dominio extracelular rico en leucina,

compartiendo además todos ellos la existencia de un dominio TIR citoplasmático (receptor Toll/IL-1) (Lehnhardt 2009). Actúan como sensores de componentes patogénicos, y entre sus funciones cabe mencionar el importante papel que desempeñan en la intersección entre la inmunidad innata y la adquirida, induciendo una cascada de señalización que determina la maduración de células dendríticas, la secreción de citoquinas proinflamatorias y la posterior inducción y diferenciación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Todos los TLRs, excepto TLR-3, transducen sus señales a través de la proteína adaptadora MyD88, provocando la producción de citoquinas proinflamatorias e inmunorreguladoras, que finalmente llevan a la activación del factor de transcripción $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) (Lehnhardt 2009) (Figura 2).

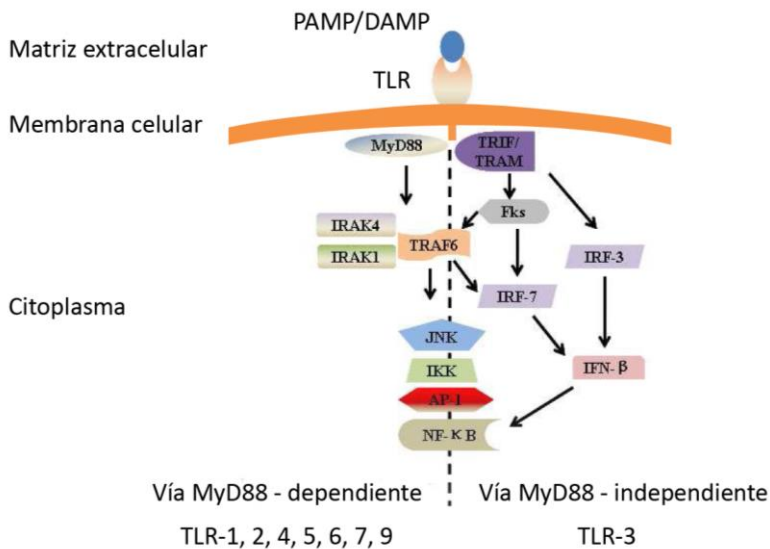


Figura 2. Vías de señalización mediadas por receptores tipo Toll (TLRs). (Esquema adaptado de Jixin Zhong et al., 2011) (Jixin Zhong, Jun-Fa Xu, Ping Yang 2011).

Los avances en el conocimiento sobre las vías de señalización mediadas por TLRs han ampliado enormemente el abanico de potenciales estrategias

terapéuticas orientadas a la modulación de la respuesta derivada de las mismas. En particular, en el contexto de enfermedades inflamatorias, desarrollo de vacunas y enfermedades infecciosas (Romagne 2007; Liu et al. 2010; Kato et al. 1994; Takeda & Akira 2004). Es importante remarcar que la completa supresión de la respuesta asociada a la señalización mediada por TLRs puede desencadenar un importante estado inmunodeprimido no deseado (Akira et al. 2006).

La presentación antigénica es clave en la respuesta inmunitaria frente a agentes patógenos. Este proceso requiere la presencia de las llamadas CPAs, capaces de fagocitar microorganismos y moléculas exógenas, y presentarlos en forma de péptidos antigénicos junto con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II en la superficie celular. Las CPAs están presentes en la mayor parte de los tejidos siendo capaces de activar a las células T en los ganglios locales de drenaje. La activación de las células T va seguida de su proliferación, diferenciación e incremento de la sensibilidad frente al antígeno en cuestión, con el fin de reestimarse en los respectivos tejidos frente a exposiciones similares posteriores. Este hecho se creyó limitado en el sistema nervioso central (SNC), fundamentalmente por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), que restringiría el paso de linfocitos, anticuerpos y complemento. Por otra parte, se pensaba que las CPAs no estaban presentes en el SNC. Sin embargo, el concepto de que el sistema nervioso representa un sitio inmunológicamente privilegiado ha sido ampliamente revisado y son muchas las evidencias que señalan que el tejido nervioso es blanco de respuestas inmunitarias mediadas por diferentes mecanismos (Lehnhardt 2009; Hickey 1999; Carson et al. 2006; Louveau et al. 2015). Esta afirmación se sustenta en diferentes observaciones, entre ellas cabe mencionar: a) la BHE no es totalmente hermética, b) se pueden inducir moléculas MHC de clase II

(reconocidas por células T CD4) en astrocitos, microglía y células endoteliales, c) se pueden inducir moléculas MHC de clase I (reconocidas por células T CD8) en neuronas, d) las células de la microglía y astrocitos pueden funcionar como CPA y e) existe drenaje linfático del sistema nervioso a ganglios linfáticos cervicales (Perry 2004; Carson et al. 2006).

Actualmente se cuestiona el grado de aislamiento del SNC por la BHE. En condiciones fisiológicas, los linfocitos pueden atravesar la BHE, las células epiteliales de los plexos coroideos y las vénulas poscapilares de las leptomeninges, migrando de este modo desde la circulación periférica hasta el líquido cefalorraquídeo (LCR), este hecho demostraría también que el SNC no constituye un lugar inmunológicamente privilegiado. La BHE es una estructura histológica y funcional que protege al SNC, está constituida por células endoteliales especializadas, las cuales presentan uniones intercelulares estrechas que restringen el paso de moléculas con carga (iones y proteínas), y se encargan de recubrir el sistema vascular cerebral. La BHE no constituye únicamente una capa pasiva de células, se trata de un complejo metabólicamente activo con múltiples bombas, transportadores y receptores para neurotransmisores y citoquinas. Esta barrera no es estanca, permite el paso de nutrientes y oxígeno, cuenta con proteínas específicas que transportan de forma activa determinadas sustancias al SNC, la glucosa es un ejemplo de ello. La BHE es esencial en el mantenimiento de la homeostasis de las neuronas y las células gliales, y en la restricción del paso de sustancias tóxicas endógenas o exógenas. La BHE interviene en el paso de células inflamatorias y mediadores químicos entre los capilares sanguíneos y el parénquima cerebral.

Estudios recientes han demostrado que el sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria promueven la pérdida neuronal descrita tanto en enfermedades crónicas del SNC, entre ellas la esclerosis múltiple y la enfermedad de

Alzheimer, como en enfermedades de carácter agudo, donde se incluiría el infarto cerebral (Kaur & Ling 2008). Algunas de las enfermedades que afectan al sistema nervioso, central y/o periférico, implican mecanismos inmunitarios claves que participan como mediadores primarios de la enfermedad; cabe destacar el caso de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la esclerosis múltiple (EM) y la encefalomielitis aguda diseminada, donde se ve alterado el sistema nervioso central; y el síndrome de Guillain-Barré, la miastenia gravis y miopatías diversas, donde el sistema nervioso periférico se encuentra afectado (Correale et al. 2011).

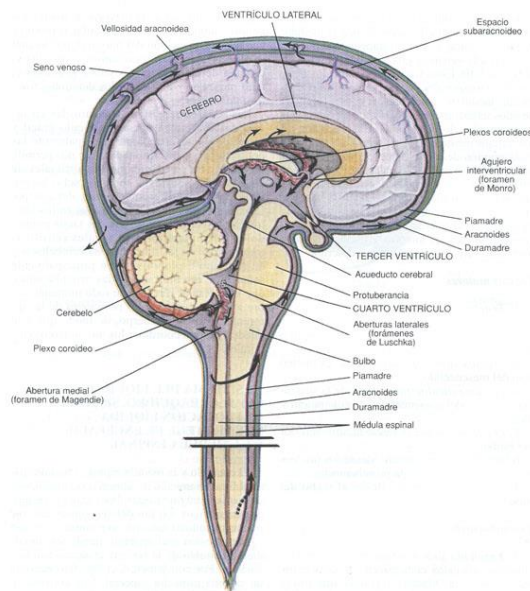


Figura 3. Sistema del líquido cefalorraquídeo y revestimientos meníngeos del encéfalo y la médula espinal. Las flechas indican el flujo del líquido cefalorraquídeo.

En condiciones patológicas puede existir un cúmulo importante de linfocitos, tanto B como T, en las meninges y el LCR, y alcanzar el parénquima encefálico a través de la BHE. La regulación del tráfico celular a través de las barreras endoteliales es fundamental en el control de la respuesta inmunitaria, de

hecho, la desregulación de este proceso se asocia con estados patológicos; la EM sería un ejemplo de ello. Una característica asociada a una parte importante de los casos de EM, es la infiltración de células inmunitarias en el SNC (Antel & Owens 1999; Adams CW, Poston RN 1989; Prineas & Wright 1978). Estas observaciones ponen de manifiesto la importancia de conocer los mecanismos que regulan la migración de linfocitos a través de la BHE (Alter et al. 2003; Hickey 2001), y suman importancia al hecho de que el estado de la BHE, particularmente de las células endoteliales, es fundamental en este proceso (Hickey 2001).

En el SN, las citoquinas son parte de la maquinaria responsable de controlar la proliferación, diferenciación y fenotipo de diferentes células, regulan la respuesta inflamatoria y la remodelación tisular, y participan en mecanismos de reparación tisular (Ransohoff & Benveniste 1996). Dos características fundamentales de las citoquinas son su pleiotropismo funcional y su redundancia. En el SNC, los astrocitos y las células de la microglía son las fuentes principales de citoquinas, aunque no las únicas; los oligodendrocitos y las células de Schwann son también capaces de producirlas. Las citoquinas median circuitos complejos de comunicación entre el SN y el SI. La secreción de citoquinas por parte de astrocitos y microglía activados induce la propagación de la respuesta inflamatoria iniciada por las células del SI. Existen citoquinas inhibitorias capaces de suprimir esta cascada de eventos, sin embargo, si estos mecanismos fallan o no son suficientes, se favorece la progresión hacia estados patológicos. La supresión o propagación de la respuesta inflamatoria se encuentra condicionada por diversos factores, entre los que cabe mencionar: el estado de activación celular, el grado de expresión de receptores de citoquinas inmunosupresoras y proinflamatorias, la concentración y localización de dichas citoquinas, y la secuencia temporal a la que un grupo de células se expone a

diferentes citoquinas. La respuesta tisular final estará determinada por todos estos factores.

El sistema nervioso está constituido por un conjunto heterogéneo de células, entre ellas: neuronas y células gliales (donde se incluyen astrocitos y microglía). Los astrocitos proveen un importante soporte estructural, metabólico y trófico a las neuronas, representan la mayor población glial del SNC, sin embargo, no se conoce completamente su papel en la activación de células T en el parénquima. Existen evidencias experimentales que demuestran que la exposición a IFN- γ hace que los astrocitos expresen mayores niveles de MHC de clase I, de moléculas coestimuladoras (CD80/86, CD40) y de moléculas de adhesión (ICAM-1, VICAM-1) (Satoh et al. 1991; Nikcevich et al. 1997). Las células microgliales representan aproximadamente un 12% del total de la población glial del SNC, y se originan a partir de precursores de monocitos/macrófagos que migran desde el saco vitelino hacia el SNC en el desarrollo; una vez allí, proliferarán originando las células microgliales residentes (Alliot et al. 1999). El factor estimulante de macrófagos, M-CSF, es considerado el mayor responsable de la regulación de la proliferación y migración de la microglía, representa el principal factor de crecimiento de este tipo celular (Alliot et al. 1999; Deverman & Patterson 2009). La población de microglía activada en el SNC procede tanto de la proliferación de la microglía residente como de la derivada del reclutamiento de monocitos. En este último caso, los mecanismos reguladores no están bien establecidos, pero se sabe que la muerte neuronal induce la colonización del SNC por parte de estas células; cuando existe lesión celular, dichas células migran con el fin de fagocitar los restos celulares (Deverman & Patterson 2009). Las células microgliales constituyen los macrófagos residentes del SNC, y actúan como primera línea de defensa frente a agentes externos mediante vías de señalización mediadas por

receptores PRPs (Lehnardt 2010; Tamashiro et al. 2012). Las células de la microglía expresan una amplia variedad de TLRs, fundamentalmente en las regiones circunventriculares y las meninges. Existen evidencias que vinculan el sistema de TLRs con fenómenos neurodegenerativos y neuroprotectores (Liu & Kielian 2009; Lehnardt 2009; Salmina et al. 2015; Drouin-Ouellet & Cicchetti 2012; Xiang et al. 2015; Perry 2004; Pocock & Liddle 2001; Bsibsi et al. 2002). La ausencia de alteración de la homeostasis neuronal mantiene a la microglía en estado 'quiescente'; la peculiaridad morfológica de este estado es la presencia de un soma acompañado de múltiples ramificaciones. La microglía puede ser activada por diferentes condiciones patológicas, entre ellas: enfermedades neurodegenerativas, lesión neural e infección en el SN (Loane & Byrnes 2010), este hecho provoca cambios en su morfología, adquiriendo un estado conocido como estado "ameboide" en el que se agranda el soma y se acortan las ramificaciones; en este estado adquiere capacidad fagocítica y es capaz de producir numerosas citoquinas, quimioquinas y radicales libres. En estado de reposo, la microglía presenta menos niveles de expresión de MHC de clase II y de otros receptores de superficie que median la fagocitosis, en comparación con los macrófagos activados de otros tejidos (Aloisi 2001; Lehnardt 2010; Pocock & Liddle 2001; Glass et al. 2010).

Las neuronas son capaces de mantener a la microglía en estado quiescente mediante interacciones celulares; algunas de ellas mediadas por el receptor CD200 y su ligando. El receptor CD200 se localiza en la microglía y constituye una glicoproteína de membrana de carácter inmunorregulador; su ligando, se expresa en neuronas y en otros tipos celulares (Neumann 2001; Wright et al. 2003). Se ha descrito que la deficiencia de CD200 en roedores hace que se incrementen los niveles de CD45 y CD11b en la microglía, adquiriendo el llamado estado 'ameboide' (Hoek et al. 2000). En ese sentido, existe otro

estudio en el que sus autores demuestran que al bloquear la actividad neuronal con tetradotoxina o antagonistas de los receptores de glutamato, el tratamiento con $\text{INF-}\gamma$ induce la expresión de MHC de clase II en células gliales, aumentando así la reactividad del tejido nervioso (Neumann et al. 1996; Neumann 2001). Los astrocitos son también capaces de contribuir al mantenimiento del estado de quiescencia de la microglía mediante la producción de IL-10 o TGF- β (factor de crecimiento transformante β) (Aloisi 2001). De este modo, tanto las neuronas como los astrocitos contribuyen al mantenimiento de la microglía en estado de reposo, en condiciones fisiológicas. La microglía actúa como sensor del daño neuronal con capacidad restauradora. Sin embargo, en condiciones patológicas, los mecanismos inhibitorios pueden fallar, la lesión neuronal impulsaría la transición de las células microgliales desde un estado de reposo, quiescente, hasta un estado activado, 'ameboide', y se incrementaría también el número de las mismas, bien sea por proliferación o por reclutamiento, con el fin de eliminar los restos de parénquima destruido, todo lo cual promovería fenómenos de reparación (Lehnardt 2009; Aloisi 2001; Neumann 2001; Hoek et al. 2000; Correale & Villa 2004). En ciertas patologías neurodegenerativas, esta función se encuentra comprometida, pudiendo llegar a perpetuarse el daño neurológico debido a la liberación de sustancias citotóxicas y proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18), quimioquinas (IL-8, MIP, MCP o RANTES), radicales libres o prostanoideos (PGD2, PGE2, tromboxano B) (Aloisi 2001).

II. NEUROPEPTIDOS

Existen células inmunitarias y neuroendocrinas capaces de producir tanto hormonas como neuropéptidos; hay evidencias de receptores comunes entre los sistemas inmunitario y neuroendocrino para estas moléculas. Algunos mediadores neuroendocrinos presentan efecto sobre procesos inmunitarios y también se sabe que existen citoquinas con efectos sobre el sistema neuroendocrino. Todo ello hace que disminuyan las diferencias tradicionalmente consideradas entre neurotransmisores, hormonas y mediadores inmunológicos. Los neuropéptidos son una de las moléculas que forman parte del mecanismo bidireccional existente entre el SN y el SI (Pozo & Delgado 2004).

Desde hace más de 40 años se sabe que los neuropéptidos actúan como señales químicas en el cerebro. Es importante destacar ciertas evidencias experimentales que apoyan esta interrelación: la secreción de péptidos tiene lugar de forma general en el sistema nervioso, las hormonas peptídicas actúan como señales químicas en el sistema endocrino y, por último, el sistema nervioso es sensible a las señales inducidas por péptidos (Klavdieva 1995). En el año 2000, Abba J. Kastin y su equipo, definieron los neuropéptidos como cualquier péptido (independientemente de la célula por la que haya sido secretado) que presenta efectos sobre el sistema nervioso (Kastin 2000). Actualmente los neuropéptidos se definen como: “sustancias de bajo peso molecular y de naturaleza proteica, producidas y liberadas por las neuronas a través de una ruta secretora regulada, y que actúan sobre sustratos neurales” (Burbach 2011). De este modo los neuropéptidos pueden considerarse como una amplia variedad de moléculas de señalización en el cerebro con multitud de funciones fisiológicas asociadas. La actividad inmunológica de los

neuropéptidos se encuentra mediada por receptores específicos presentes en células del sistema inmunitario (Delgado et al. 2004).

1. Péptido intestinal vasoactivo

En el año 1968, Sami I. Said trató de aislar un péptido vasodilatador a partir de biopsias pulmonares, basándose en la observación de que los pacientes con enfermedad pulmonar grave o embolia pulmonar, desarrollaban con frecuencia hipotensión y shock sistémico. Sin embargo, este aislamiento no fue adecuado en términos de pureza debido a la escasez de tejido (Piper et al. 1970). Meses más tarde, el Dr. Said en colaboración con el Dr. Mutt lograron aislar este péptido y caracterizarlo de forma exitosa en muestras de tejido intestinal de cerdo, duodeno concretamente (Said & Mutt 1970a; Said & Mutt 1970b). A este péptido recién identificado le fueron asociadas propiedades vasodilatadoras e hipotensoras en base a los resultados del estudio, y le otorgaron el nombre de péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Said & Mutt 1970a). Años más tarde, el VIP fue identificado en sistema nervioso central y periférico (Said & Rosenberg 1976). Las evidencias del efecto de VIP sobre el sistema inmunitario no llegaron hasta 1981, de la mano de los trabajos pioneros de Guerrero y O'Dorisio, quienes describieron por primera vez la interacción de VIP con células mononucleares de sangre periférica en humanos (Guerrero et al. 1981; O'Dorisio et al. 1981; Danek et al. 1983).

Este péptido ha pasado de ser considerado un mero neuropéptido/hormona a considerarse un novedoso agente inmunomodulador, con características que hacen que pueda ser calificado como una citoquina (Pozo & Delgado 2004). El hecho de que en 1974 se comunicase su localización en los terminales sinápticos y que posteriormente se definiera su bioquímica, hizo que se acuñasen los términos neuropéptido/neurotransmisor en su definición. VIP ha

sido considerado como un neuropéptido ampliamente distribuido, capaz de actuar como neurotransmisor o neuromodulador en numerosos órganos y tejidos, entre ellos: corazón, pulmones, glándula tiroidea, riñones, sistema inmunitario, tracto urinario y órganos genitales (Henning & Sawmiller 2001; Moody et al. 2011). Esta amplia distribución de VIP hace que participe en numerosos procesos biológicos, entre los que podemos destacar: vasodilatación sistémica, incremento del gasto cardíaco, broncodilatación, hiperglucemia, relajación del músculo liso, regulación hormonal, analgesia, hipertermia, efectos neurotróficos, comportamiento y aprendizaje, metabolismo óseo, motilidad gástrica, y otros efectos secretores a nivel del tracto gastrointestinal (Delgado et al. 2004; Morell et al. 2012).

VIP tiene una estructura primaria de 28 aminoácidos, presenta cierta homología estructural con otras hormonas gastrointestinales tales como la secretina, el glucagón, el péptido inhibidor gástrico, el péptido histidina-metionina (PHM, en tejidos humanos) o el péptido histidina-isoleucina (PHI, su equivalente en otros mamíferos), la helodermina, el factor liberador de la hormona de crecimiento o el polipéptido activador de la adenilil ciclasa pituitaria (PACAP) (Absood et al. 1992; Delgado et al. 2004). Concretamente con PACAP, VIP comparte algunos de sus receptores, debido al 68% de homología estructural existente entre ambos (Miyata et al. 1989; Miyata et al. 1990).

La estructura primaria de VIP se encuentra altamente conservada en todas las especies, lo cual da a entender un papel fisiológico relevante (Sherwood et al. 2000). VIP es sintetizado a partir de una molécula precursora que cuenta con 170 aminoácidos, prepro-VIP, esta molécula también origina PHM/PHI (Bloom et al. 1983). El prepro-VIP es metabolizado por una peptidasa en el retículo endoplasmático, originando el llamado pro-VIP (148 aminoácidos). Esta última

molécula es posteriormente procesada por una prohormona convertasa que da lugar a VIP-GKR y a PHM-GKR (Bloom et al. 1983); estos fragmentos son a su vez procesados por una enzima similar a la carboxipeptidasa-B, generando VIP-G y PHM-G (Itoh et al. 1983). En última instancia, enzimas amidantes liberan VIP y PHM en su conformación definitiva. El gen humano de VIP se encuentra localizado en la región cromosómica 6q24, cuenta con un tamaño de 8837 bp e incluye 7 exones, cada uno de ellos codifica un dominio funcional del ARN mensajero de la proteína precursora de VIP (Delgado et al. 2004).

VIP ejerce su acción de forma paracrina y/o autocrina a través de tres receptores: VPAC1, VPAC2 y PAC1, los cuales pertenecen a la subfamilia B1 de los receptores acoplados a proteínas G (Harmar et al. 2012). Estos receptores comparten una arquitectura molecular común, formada por siete dominios transmembrana, tres lazos extracelulares y tres intracelulares, un largo dominio amino-terminal extracelular y uno carboxi-terminal intracelular. Intracelularmente, los receptores de VIP actúan a través de 2 rutas de transducción de señales: I) Activando a la adenilil ciclasa y a la proteína quinasa A (PKA) y II) Activando las fosfolipasas C y D (PLC y PLD). El receptor PAC1 se acopla de forma preferente a la PLC, mientras que VPAC1 y VPAC2 normalmente se acoplan a la adenilil ciclasa (Pozo et al. 1997; Delgado et al. 2004). En la activación de estas rutas de transducción de señales están implicadas distintas subunidades proteicas $G\alpha$. Así, $G\alpha_s$ es la responsable de la activación de la adenilil ciclasa, mientras que $G\alpha_q$ y $G\alpha_i$ se encargan de activar a la PLC y PLD, respectivamente (Pozo et al. 1997; Dickson & Finlayson 2009). Son numerosas las evidencias que demuestran la amplia distribución de los receptores de VIP y PACAP, presentes en sistema nervioso, inmunitario y endocrino, entre otros. La amplia distribución de estos receptores explicaría los efectos pleiotrópicos asociados a ambos neuropéptidos, entre los que podemos

destacar sus propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias (Moody et al. 2011).

En el año 1981 se describió por primera vez la presencia de sitios de unión a VIP y se caracterizaron molecularmente como receptores del mismo en el sistema inmunitario, concretamente en linfocitos humanos de sangre periférica, actualmente se ha descrito en prácticamente todos los tipos de células inmunitarias (Guerrero et al. 1981; O'Dorisio et al. 1981; Danek et al. 1983; Pozo 2003). En general, la presencia de un tipo u otro de receptor varía en función del tipo celular y de su estado de activación. A pesar de los avances en el estudio de los patrones de expresión de los receptores de VIP, la función biológica de los mismos en las células inmunitarias aún no se conoce al completo. Una de las herramientas más útiles empleadas para dilucidar esta incógnita es el uso de modelos animales *knock-in* (KI) de sobreexpresión o de activación permanente, y de modelos animales *knock-out* (KO) para los diferentes receptores (Pozo 2003; Dickson & Finlayson 2009).

El empleo del VIP como agente terapéutico suscita interés en muchas áreas relacionadas con el asma (Onoue et al. 2007; Said et al. 2010), la neuroprotección (Gozes 2008; Gozes et al. 1998; Gozes & Furman 2003), la inflamación y las enfermedades autoinmunes (Abad et al. 2003; Hamidi et al. 2008; Keino et al. 2004; Pozo et al. 2009).

1.1. Funciones de VIP en el sistema nervioso central: enfermedades neurodegenerativas

Inicialmente este péptido fue catalogado como hormona intestinal, debido a que fue aislado por primera vez a partir de tejido intestinal y sus efectos sobre la secreción electrolítica fueron demostrados (Said & Mutt 1970a). Sin

embargo, posteriormente se publicaron evidencias que le asociaban un papel importante como neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema nervioso periférico (SNP), demostrándose también su amplia distribución a lo largo de todo el sistema nervioso (SN); estas evidencias han dado pie a múltiples hipótesis sobre las posibles funciones de VIP (Dickson & Finlayson 2009).

Es importante mencionar, que tanto VIP como PACAP y los receptores asociados a ambos, no sólo se expresan en numerosas regiones del SN, sino que también se expresan en células y tejidos no neuronales de la periferia. Desde que VIP y PACAP fueron aislados y descritos han sido numerosos los estudios publicados sobre su distribución en diversos tejidos. A pesar de la amplia distribución de VIP en diferentes regiones cerebrales, cabe destacar que esta expresión es particularmente mayor en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, el núcleo supraquiasmático y el hipotálamo (Dickson & Finlayson 2009). Hay estudios que postulan que VIP facilita el metabolismo del glucógeno, regula el crecimiento embrionario y promueve la supervivencia neuronal (Sorg & Magistretti 1992).

Los neuropéptidos y las proteínas neurotróficas realizan una amplia variedad de funciones aparentemente no relacionadas. Al neuropéptido VIP se le otorgan propiedades neurotróficas, actuando como neurotransmisor y neuromodulador en el SNC (Passemar et al. 2011). Existen evidencias que demuestran que VIP está asociado al estímulo de la mitosis en astrocitos (Brenneman et al. 1990), al incremento de supervivencia neuronal (Brenneman & Eiden 1986; Brenneman et al. 1985; Pincus et al. 1990), al fomento del crecimiento embrionario en sus fases iniciales (Gressens et al. 1993; Gressens et al. 1994), a la diferenciación neuronal de células madre embrionarias murinas (Cazillis et al. 2004), a la regulación de los ritmos circadianos en el

núcleo supraquiasmático (Shinohara et al. 1994; Piggins & Cutler 2003), a la regulación de las secreciones neuroendocrinas en el hipotálamo (Rostène 1984), al metabolismo energético de las células gliales (Magistretti et al. 1998) y a la proliferación, maduración o supervivencia de células gliales (Fuxe et al. 1977). En este sentido, es también importante mencionar que VIP inhibe la respuesta aguda inflamatoria tras dañar la médula espinal (Kim et al. 2000) y previene la neurodegeneración asociada a la activación de la microglía bajo condiciones inflamatorias (Delgado & Ganea 2003) mientras que incrementa la síntesis de la proteína ADNP (del inglés, *activity-dependent neuroprotective protein*) (Bassan et al. 1999).

VIP es sintetizado en neuronas del SNC y actúa sobre sus receptores, que se expresan a lo largo de todo el SNC. Estas neuronas son capaces de regular interacciones neuro-inmunitarias (Fuxe et al. 1977). Destacan una serie de efectos indirectos de VIP sobre el SNC, entre los que incluiríamos: expresión y secreción de factores neurotróficos, citoquinas y quimioquinas en células gliales (Brenneman et al. 1997; Dejda et al. 2005; Schwartz 1992; Sorg & Magistretti 1992). Otra de las características que apoya el hecho de considerar a VIP como un agente neuroprotector es su capacidad para inducir, en astrocitos, la secreción de diferentes agentes neuroprotectores, entre ellos: la proteína llamada ADNF (del inglés, *activity-dependent neurotrophic factor*), descrita por primera vez en 1996 (Brenneman & Gozes 1996), y la proteína ADNP (Gozes et al. 2000; Brenneman et al. 2000). Hay evidencias que demuestran la implicación de VIP en la regulación de los niveles de glutamato en las fases iniciales del desarrollo sináptico de neuronas excitatorias, vinculando también al neuropéptido VIP con el desarrollo del aprendizaje y comportamiento en el sistema nervioso adulto (Blondel et al. 2000). VIP es también capaz de regular el factor de crecimiento dependiente de insulina, así como, el factor

neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), siendo importante destacar la implicación de ambos en la regulación que tiene lugar como consecuencia de la lesión neuronal (Servoss et al. 2001; Hill et al. 2002). VIP ha demostrado también ser capaz de reducir la excitotoxicidad asociada al edema pulmonar (Said et al. 1996) y a las lesiones de la sustancia blanca (Passemard et al. 2011), sugiriendo un efecto de las vías de señalización asociadas a VIP sobre las de glutamato.

Cabe remarcar el hecho de que la barrera hematoencefálica (BHE) cuenta con receptores de VIP, este neuropéptido es capaz de atravesar dicha barrera por difusión transmembrana, mediante un mecanismo no saturable, hasta llegar al parénquima cerebral (Dogrukol-Ak et al. 2004). No menos importante son los receptores de VIP presentes en los vasos sanguíneos de pequeño calibre que rodean los espacios perivasculares, también llamados espacios de Virchow-Robin. En este contexto, VIP parece estar implicado en el mantenimiento de la integridad funcional de la BHE, influyendo en la permeabilidad, coordinando vías neuroreguladoras, y protegiendo frente a la apoptosis neuronal. Algunas hipótesis sugieren que el ataque autoinmune frente a VIP o sus receptores podría afectar la función de la BHE, alterando de este modo la homeostasis en el SNC, lo que podría inducir el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Staines et al. 2009).

El neuropéptido VIP juega un papel clave en el desarrollo del SNC, existen evidencias que demuestran que las alteraciones de los niveles de VIP en el tejido nervioso de pacientes adultos se encuentran estrechamente vinculadas con el inicio y progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas, como puede ser el caso de la esclerosis múltiple (EM), la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer (EA) (Revisado en (Morell et al. 2012)). En este sentido, existen evidencias experimentales que demuestran que algunos

trastornos neurológicos cursan también con alteración en los niveles basales de VIP (Revisado en (Morell et al. 2012)). Son numerosos los estudios que vinculan la inflamación con la neurodegeneración asociada a ciertas enfermedades neurológicas (Glass et al. 2010).

En determinadas lesiones agudas del SNC, como la isquemia, el trauma cerebral y la epilepsia, la producción de citoquinas proinflamatorias y prostaglandinas participa de forma clave en el proceso neurodegenerativo asociado a las mismas. (Vezzani et al. 2002). Del mismo modo, en el caso de ciertas lesiones crónicas en el SNC, los factores ambientales, el componente hereditario y el envejecimiento influyen en gran medida en la activación del sistema inmunitario, propiciando el desarrollo y/o progresión de la patología. Algunos ejemplos de estas lesiones crónicas serían EM, EP, EA y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Amor et al. 2014; Campbell 2004). Son muchas las estrategias terapéuticas llevadas a cabo con el fin de inmunosuprimir el estado de activación del sistema inmunitario asociado a estas patologías, sin embargo, a pesar de que algunas de ellas consiguen retrasar el inicio de los síntomas, el resultado no fue exitoso en términos de eficacia terapéutica, lo cual deja entrever el componente multifactorial característico al desarrollo de las mismas.

En el caso de la EM se ha demostrado que estos pacientes presentan niveles menores de VIP en el LCR en comparación con los individuos sanos (Andersen et al. 1984). A este hecho le sumamos que estudios llevados a cabo en modelos animales de EM, revelan que tanto VIP como PACAP juegan un papel importante en el transcurso de la misma, debido fundamentalmente a sus propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias (Gonzalez-Rey et al. 2006; Abad & Waschek 2011; Tan & Waschek 2011). Estos datos ponen de manifiesto la importancia del VIP exógeno como neuroprotector frente a la degeneración

asociada a esta enfermedad. Sin embargo, en el año 2010, Abad y sus colaboradores, llevaron a cabo un estudio empleando el modelo animal de encefalitis experimental autoinmunitaria (EAE, modelo animal que simula las manifestaciones clínicas de EM observados en humanos), en el que demostraron que la ausencia de VIP endógeno confería resistencia frente al desarrollo de la EAE, con retraso en el inicio de los síntomas y con manifestaciones clínicas menores o incluso ausentes (Abad et al. 2010). Todo ello pone de manifiesto la complejidad del papel que el neuropéptido VIP juega en el desarrollo de esta enfermedad neuroinflamatoria y autoinmunitaria, como veremos en detalle posteriormente.

Si hacemos referencia a la EP encontramos estudios que demuestran que si bien las neuronas productoras de VIP no se encuentran afectadas en cerebros de pacientes con EP (Jégou et al. 1988), cuando se analizan los niveles de VIP en médula adrenal, se comprueba que los pacientes con EP presentan niveles reducidos de VIP respecto a los individuos sin patología conocida (Stoddard et al. 1991). A todo ello, podemos sumarle que en un modelo de Parkinson en ratas se observó que la administración sistemática de VIP resultó ser efectiva para revertir los fallos motores asociados a la patología; del mismo modo, se observó que se redujo la muerte neuronal y la pérdida de la vaina de mielina (Tunçel et al. 2005). Sin embargo, los bajos niveles de dopamina característicos de esta enfermedad no se restauraron (Tunçel et al. 2005). Existen evidencias que demuestran el papel neuroprotector de VIP en diferentes modelos empleados en el estudio de EP (Gonzalez-Rey et al. 2005).

En el caso de la EA, en 1988 se observó la existencia de un incremento importante de la actividad de la adenilil ciclasa en el hipocampo de pacientes, en comparación con los individuos sin patología conocida (Danielsson et al. 1988). Veinte años después se demostró el papel terapéutico de VIP en esta

patología, ensayos *in vitro* indicaron que este neuropéptido era capaz de reducir la neurodegeneración asociada al péptido β -amiloide (A β), debido a la inhibición de citoquinas proinflamatorias y de agentes neurotóxicos secretados por células microgliales activadas (Delgado et al. 2008). A través del receptor VPAC1, VIP induce la secreción de proteínas gliales neuroprotectoras, entre las que se encuentra el factor ADNF que promueve la supervivencia neuronal (Delgado et al. 2008; Gozes & Brenneman 2000).

Todas estas observaciones sustentarían la importancia de VIP como agente terapéutico en ciertas enfermedades neurodegenerativas del SNC, así como en enfermedades neuroinflamatorias, debido a las propiedades inmunomoduladoras y neurotróficas asociadas a este neuropéptido.

1.2. Funciones de VIP en el sistema inmunitario

En 1978 se demostró la presencia de VIP en células inmunitarias, concretamente en mastocitos peritoneales de rata (Cutz E, Chan W, Track NS, Goth A 1978). Años más tarde, en 1981, se describió por primera vez la interacción de VIP con células mononucleares de sangre periférica en humanos (Guerrero et al. 1981; O'Dorisio et al. 1981). Posteriormente, en el año 1994, Rosa P. Gomariz y su equipo describieron por primera vez la expresión de VIP en timocitos de ratas y en linfocitos B y T procedentes de bazo y nódulos linfáticos (Gomariz et al. 1994).

Numerosos hallazgos ponen de manifiesto el papel antiinflamatorio asociado al neuropéptido VIP, que actúa regulando la producción de mediadores antiinflamatorios y proinflamatorios (Gonzalez-Rey et al. 2007). Las propiedades asociadas a VIP lo hacen especialmente interesante en el control de los mecanismos de tolerancia inmunológica. Es importante resaltar que bajo

condiciones de estrés inflamatorio o en respuesta a determinados antígenos, este neuropéptido es producido por células del sistema inmunitario, fundamentalmente por células Th2 y por células T CD8 tipo 2 (Delgado et al. 2002; Pozo & Delgado 2004; Delgado & Ganea 2001). Por otra lado cabe remarcar, que como mencionamos anteriormente, VIP ejerce sus efectos biológicos a través de receptores acoplados a proteína G (VPAC1, VPAC2 y PAC1), los cuales se expresan en una amplia variedad de células inmunitarias. Las vías de señalización adscritas, implican la activación del eje AMPc/PKA (adenosín monofosfato cíclico/ proteína kinasa A), que lleva consigo asociado un efecto inmunosupresor (Delgado et al. 2004).

Los macrófagos tienen un papel importante tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adaptativa, siendo algunas de sus funciones la fagocitosis, el procesamiento y la presentación de antígenos, la secreción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Se sabe que el estímulo con lipopolisacárido (LPS), agonista de TLR-4, induce la secreción de especies proinflamatorias por parte de los macrófagos, entre ellas: TNF- α , IL-12, IL-1, IL-6 y óxido nítrico (NO), dicha respuesta viene seguida por la secreción de citoquinas inmunorreguladoras como son IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Laskin & Pendino 1995). Los macrófagos son piezas claves en la protección del huésped frente a agentes nocivos. Sin embargo, la prolongada producción de sustancias proinflamatorias y de NO puede desencadenar determinadas patologías, algunos ejemplos de ello serían, el shock séptico, las enfermedades autoinmunitarias, la enfermedad inflamatoria intestinal y el síndrome de dificultad respiratoria (Pozo et al. 2000). Por todo ello se hace especialmente importante el estudio del control del balance entre los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios. En este contexto, el neuropéptido VIP ha

demostrado inhibir la actividad de los linfocitos T estimulados así como la actividad de ciertos macrófagos, pudiendo de este modo actuar como un importante regulador endógeno de la respuesta inflamatoria (Pozo et al. 2000; Ganea 1996). Parece que los efectos de VIP dependen del tipo de receptor predominante en la superficie del macrófago y del estado de diferenciación o activación del mismo (Delgado et al. 2004).

Son muchos los trabajos publicados que indican que el neuropéptido VIP es un potente modulador de la acción de las células del sistema inmunitario innato. Se ha demostrado, tanto en estudios *in vitro* como en estudios *in vivo*, que VIP inhibe la producción de NO y de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-12 e IL-6) y que de forma paralela, es también capaz de estimular la secreción de mediadores inmunorreguladores como IL-10 y el receptor soluble de IL-1 β ; del mismo modo, puede también inhibir la fagocitosis, la producción de radicales libres y la adherencia y migración de macrófagos (Delgado et al. 2004; Delgado et al. 2002; De la Fuente et al. 1996). Curiosamente, VIP presenta una acción dual frente a producción de IL-6, por un lado promueve la secreción de IL-6 en macrófagos no estimulados o tras el estímulo con bajas dosis de LPS, y por otro lado, en modelos de inflamación y de endotoxemia, inhibe la secreción de dicha citoquina (Martinez et al. 1998). Todos estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia del neuropéptido VIP en la homeostasis inmunológica (Pozo et al. 2000). En base a números trabajos puede decirse que son los macrófagos/monocitos los principales encargados de mediar la acción antiinflamatoria asociada a VIP.

A nivel de inmunidad adaptativa, es importante resaltar que tanto la activación como la diferenciación de linfocitos T naive a células efectoras y de memoria, se ve enormemente afectada por VIP. La activación antígeno-dependiente de los linfocitos T CD4 precisa de la señal proporcionada por las CPAs, representadas

principalmente por células dendríticas y macrófagos en la periferia, y por microglía en el SNC. Uno de los mecanismos mediante el cual VIP es capaz de ejercer su acción antiinflamatoria es por la reducción del efecto de las CPAs, para ello VIP reduce la expresión de la molécula coestimuladora CD80/CD86. Esta inhibición de la expresión de CD80/CD86 se correlaciona con la reducción de la estimulación que induce la proliferación antígeno-dependiente de los linfocitos T (Delgado et al. 2004). Otra de las vías por la cual VIP ejerce su efecto antiinflamatorio, consiste en la inhibición de la respuesta de las células Th1, tanto por reducción de los niveles de citoquinas secretados por dichas células, como por reducción del número de citoquinas secretadas (Delgado et al. 2004). Años más tarde, también se demostró que VIP era capaz de inducir la diferenciación de células T CD4⁺ CD25⁻ humanas a células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, con potente actividad reguladora frente a las células T efectoras. Estos hallazgos ponen de manifiesto el potencial de VIP como una herramienta valiosa en las intervenciones terapéuticas al promover la tolerancia frente a los trasplantes, reduciendo de este modo la necesidad del uso de fármacos inmunosupresores (Pozo et al. 2009).

1.3. Estudios funcionales *in vivo*: uso de animales modificados genéticamente

Una de las herramientas más útiles en el estudio del papel de VIP, PACAP y sus receptores, ha sido el empleo de animales *knock out* (KO), facilitando de este modo conocer su papel fisiológico, fisiopatológico y su potencial farmacológico, ya que actualmente no existen agonistas/antagonistas de alta afinidad a estos receptores que permitan llevar a cabo estos estudios (Tabla 1). De este modo, se ha podido demostrar el importante papel que juegan en el metabolismo, la obesidad, el control de la liberación de insulina, en disfunciones

gastrointestinales y en patologías asociadas al SNC, concretamente existen evidencias de su implicación en enfermedades como la esquizofrenia y la depresión (Revisado en (Morell et al. 2012)). Estos hallazgos pondrían de manifiesto que VIP y sus receptores pueden constituir una prometedora vía en el tratamiento de diferentes enfermedades neurológicas.

Tabla 1. Modelos murinos nulos para VIP, PACAP o sus receptores.

Modelos Knock out (ratón)	Genotipo	Referencia
VIP KO	<i>Vip</i> -/-	Colwell et. al, 2003
PACAP KO	<i>Pacap</i> -/-	Hashimoto et. al, 2001
VPAC1 KO	<i>Vpac1</i> -/-	Fabricius et. al, 2011
VPAC2 KO	<i>Vipr2</i> -/-	Goetz et. al, 2001
PAC1 KO	<i>Pac1</i> -/-	Jamen et. al, 2000

El primer modelo de ratón transgénico para VIP con reducción en la expresión del neuropéptido fue descrito en el año 1993 por Gozes y sus colaboradores. La reducción del 20% de la expresión de VIP en el cerebro tuvo como consecuencia déficits en el aprendizaje asociados a pérdida en la adquisición de memoria; los machos presentaron también actividad sexual reducida (Gozes et al. 1993). En el año 2003, de la mano de Cowell y sus colaboradores surgió el primer modelo animal KO para VIP (VIP KO) (Colwell et al. 2003). Existen evidencias que muestran que los animales VIP KO presentan alteraciones en la morfología intestinal, una motilidad intestinal reducida y un alto riesgo de muerte por estenosis intestinal (Lelievre et al. 2007). Conjuntamente, se ha

demostrado que los machos VIP KO presentan menores niveles de testosterona circulante, aunque a pesar de ello, no se altera la reproducción de dichos animales; también se ha encontrado que esta alteración hormonal parece ser que reduce la degeneración testicular asociada al envejecimiento (Lacombe et al. 2007).

Son muchos los estudios llevados a cabo con animales transgénicos para VIP, desde aquellos que sobreexpresan el neuropéptido, hasta aquellos en los que la expresión de VIP es reducida o nula (KO) (Gozes et al. 1993; Kato et al. 1994; Colwell et al. 2003). El foco principal de estos estudios ha sido esencialmente el impacto de este neuropéptido sobre los ritmos circadianos y la hipertensión pulmonar (Dickson & Finlayson 2009; Aton et al. 2005).

Estudios llevados a cabo sobre el modelo de ratón de VIP-KO, VPAC2-R KO y PAC1-KO, han demostrado que tanto VIP como PACAP, y sus receptores, son esenciales en el mantenimiento normal de los ritmos circadianos (Dickson & Finlayson 2009; Cutler et al. 2003; Brown et al. 2007; Georg et al. 2007; Colwell 2004).

Existen también estudios llevados a cabo sobre el efecto de la ausencia de VIP endógeno en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. Como mencionamos anteriormente, en el año 2010, Abad y colaboradores estudiaron el efecto de la ausencia de VIP endógeno en el modelo de EAE, observando que, en un alto porcentaje, los animales eran resistentes al desarrollo de EAE, y que en los casos en los que se desarrollaba el proceso patológico asociado a este modelo, se retrasaba el inicio de los síntomas y las manifestaciones clínicas eran menores o ausentes (Abad et al. 2010).

El efecto de PACAP endógeno también ha sido explorado en el contexto de enfermedades neurodegenerativas, concretamente en el modelo SOD1^{G93A} para

el estudio de la ELA. Ringer y colaboradores, publicaron un estudio en el que demostraban que ratones SOD1^{G93A} carentes de PACAP (*knock out* para PACAP) veían extendida su supervivencia de forma significativa en comparación con los animales SOD1^{G93A} empleados como control (Ringer et al. 2013). Demostraron también el papel dual asociado a PACAP en el contexto de la ELA. Observan que presenta un efecto neuroprotector sobre neuronas visceromotoras y una acción opuesta sobre la función microglial en ratones SOD1^{G93A}. Este hecho pone de manifiesto la complejidad del papel que PACAP juega en el contexto de esta enfermedad neurodegenerativa (Ringer et al. 2013).

2. ADNF/ADNP/NAP

Con el fin de avanzar en el conocimiento sobre el modo en el que VIP ejerce sus efectos neuroprotectores a través de las células gliales, se aislaron y caracterizaron diferentes proteínas intermediarias. La primera de ellas se descubrió en 1996, de la mano de Brenneman y Gozes; se le asociaron importantes propiedades neuroprotectoras y fue llamada 'Activity-dependent neurotrophic factor' (ADNF) (Brenneman & Gozes 1996). La secreción de ADNF tiene lugar en la astrogliya y es inducida por VIP. ADNF demostró proteger a las neuronas de la muerte asociada al bloqueo de la actividad eléctrica (Gozes & Brenneman 1996; Gozes & Brenneman 2000). Existen evidencias experimentales que demuestran que la acción neuroprotectora de VIP está mediada por diferentes moléculas cuya secreción está inducida por dicho neuropéptido, ADNF es una de ellas. Estas moléculas han demostrado proteger frente a la muerte neuronal inducida por tetradotoxina en cultivos de homogeneizados de médula espinal (Brenneman et al. 1997). Los resultados demuestran que son importantes frente a la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad (Brenneman et al. 1997). Existen otros estudios que apoyan el papel neuroprotector asociado a ADNF, estos autores demuestran que ADNF

promueve la supervivencia neuronal (Gozes et al. 1997). Con el fin de encontrar otros mediadores responsables de los efectos neuroprotectores de VIP, y basándose en el hecho de que anticuerpos contra ADFN inducían apoptosis neuronal y prevenían la sinaptogénesis (Blondel et al. 2000), se emplearon anticuerpos similares frente a ADFN-9. ADFN-9 es un péptido de 9 aminoácidos, incluido en la proteína ADFN, que conserva los efectos neuroprotectores de la proteína completa y consigue superar la actividad biológica de la misma (Brenneman et al. 1998). Estos anticuerpos se emplearon sobre una genoteca de expresión de neuroglia de ratón, y permitieron descubrir la llamada '*activity-dependent neuroprotective protein*' (ADNP). ADNP es otro mediador glial de la actividad neuroprotectora de VIP, la secreción de ADNP es inducida por VIP (Bassan et al. 1999). El anticuerpo reconocía específicamente una secuencia de 8 aminoácidos, la secuencia NAPVSIPQ. A este octapéptido se le denominó NAP (Gozes, Morimoto, et al. 2005), y se consideró un potente neuroprotector capaz de evitar la muerte neuronal asociada al bloqueo eléctrico por tetrodotoxina y a la excitotoxicidad por NMDA (Bassan et al. 1999). En el año 2001, a cargo de Zamostiano y sus colaboradores, tuvo lugar la clonación y caracterización de ADNP en humanos (Zamostiano et al. 2001). El gen de ADNP en humanos se localiza en la región cromosómica 20q12-13.2 y consta de 40647 bp. Está formado por 5 exones y 4 intrones. El ARNm tiene un tamaño de 4713 bp para la variante 1 del transcrito y de 4538 bp para la variante 2 (Zamostiano et al. 2001).

La proteína ADNP en humanos tiene un peso molecular de 123.5 kDa, 1102 aminoácidos, un punto isoelectrico de 6.97 y presenta las siguientes características estructurales: 9 dedos de zinc (idénticos en ratón), una región rica en prolina, una secuencia de importación-exportación celular rica en leucina, un dominio homeobox y un sitio activo glutarredoxina. Estas

características sugieren una localización nuclear y una función como proteína asociada al ADN (Zamostiano et al. 2001; Illana Gozes et al. 2003).

Como se mencionó anteriormente, el descubrimiento del octapéptido NAP fue simultáneo al descubrimiento de ADNP (Bassan et al. 1999). NAP presenta un peso molecular de 824,9 Da y la secuencia de aminoácidos que conforma su estructura es la siguiente: Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (Gozes, Morimoto, et al. 2005).

Es importante destacar que NAP es capaz de atravesar membranas lipídicas, pasando de este modo a través de membranas celulares y de la barrera hematoencefálica (Gozes & Divinski 2004). Este octapéptido es capaz de unirse a la tubulina y promover el ensamblaje apropiado de los microtúbulos y es también capaz de bloquear el plegamiento en hoja β de otros polipéptidos (Brenneman et al. 2004). La eficacia de NAP no depende del isómero que se utilice, tanto la conformación D- como la conformación L- son igualmente efectivas en los distintos modelos experimentales ensayados (Brenneman et al. 2004).

Estudios publicados demuestran que en modelos animales de daño cerebral por traumatismo craneoencefálico se detectan niveles aumentados de ADNP tras provocar el daño para desarrollar el modelo (Zaltzman et al. 2004). Este incremento tiene lugar en astrocitos y microglía localizados en el área lesionada. Se observa que el tratamiento con NAP mejora el estado de los animales, reduciendo la severidad del traumatismo (Gozes, Zaltzman, et al. 2005). El tratamiento con NAP reduce la inflamación inicial, en términos de niveles de TNF- α , y el edema asociado a este modelo animal de lesión cerebral (Beni-Adani et al. 2001). Al analizar la región lesionada en estos animales, se observaron niveles aumentados de la glicoproteína Mac-1 (CD11B),

curiosamente dichos niveles se reducían cuando los animales eran tratados con NAP (Zaltzman et al. 2003). Esta glicoproteína se conoce también como receptor de complemento tipo 3 (CR3), y consta de dos subunidades transmembrana: α_m (CD11b) y β_2 (CD18) (Reichert et al. 2001). Mac-1 se expresa en la superficie celular de la mayoría de las células de origen mieloide, incluyendo la microglía (González-Scarano & Baltuch 1999), y se sabe que juega un papel importante en el proceso inflamatorio (Benimetskaya et al. 1997; Tan et al. 2000). Evidencias experimentales demuestran que los animales nulos para Mac-1 son menos susceptibles al daño cerebral. Se observó también que estos animales no muestran niveles aumentados de ADNP tras provocar dicha lesión. Todo ello pone de manifiesto que la ausencia del mediador inflamatorio Mac-1 reduce la necesidad de inducir factores neuroprotectores tales como ADNP. Esta observación apoyaría el papel de la proteína ADNP en el contexto del proceso inflamatorio (Gozes, Zaltzman, et al. 2005; Zaltzman et al. 2005).

La proteína ADNP ha sido asociada a ciertos trastornos neurológicos tales como la esclerosis múltiple (EM), la enfermedad de Alzheimer (EA), esquizofrenia y autismo. La evaluación de los niveles de expresión de ADNP en linfocitos de pacientes con esquizofrenia revela un incremento de los mismos en comparación con los individuos control, lo cual puede resultar interesante como un potencial marcador para el diagnóstico de dicha enfermedad (Merenlender-Wagner et al. 2013). Se observó también un comportamiento diferencial en función del sexo, ya que dichos niveles se redujeron a medida que progresaba la enfermedad en el caso de las mujeres con esquizofrenia (Merenlender-Wagner et al. 2013). Este incremento en los niveles de expresión de ADNP en pacientes con esquizofrenia contrasta con la reducción de los mismos en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EM (Braith et al. 2009), y con la reducción de los niveles de la proteína ADNP en

suero de pacientes con EA en comparación con los individuos sanos (Yang et al. 2012; Malishkevich et al. 2015).

2.1. Funciones de NAP en el sistema nervioso central: enfermedades neurodegenerativas

El potencial neuroprotector de NAP se comenzó a desvelar a partir de los primeros estudios llevados a cabo por Bassan y sus colaboradores. Estos estudios se realizaron sobre cultivos mixtos de neuronas y células gliales procedentes de la corteza cerebral de ratas (Bassan et al. 1999).

NAP ha demostrado tener capacidad neuroprotectora en el contexto de enfermedades neurodegenerativas, ejemplos de ello serían la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis múltiple. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, NAP ejerce un importante efecto frente a la neurotoxicidad derivada del péptido A β , principal toxina asociada a esta patología. NAP demostró sus efectos tanto en cultivos corticales mixtos de neurona-glía de rata (Bassan et al. 1999), como en cultivos neuronales corticales de rata (Zemlyak et al. 2007). Este octapéptido es capaz de interferir en el ensamblaje de las fibras A β e inducir su desagregación (Ashur-Fabian et al. 2003). Atendiendo al caso de la esclerosis múltiple, Gozes y sus colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que demostraron los efectos beneficiosos derivados de la administración de NAP a animales del modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), modelo empleado en el estudio de la esclerosis múltiple. NAP demostró proteger frente a la parálisis asociada y frente al daño axonal característico a dicha patología (Gozes et al. 2003).

Existen también evidencias que demuestran que NAP es capaz de evitar la muerte neuronal derivada de la excitotoxicidad mediada por los receptores de

glutamato tipo NMDA en cultivos mixtos de neurona-glía de rata (Li et al. 2005; Liu et al. 2001), así como de la excitotoxicidad mediada por kainato en cultivos mixtos de hipocampo fetal de rata (Zemlyak et al. 2007; Zemlyak et al. 2009). Los receptores de glutamato tipo NMDA y/o los receptores tipo kainato presentan un papel importante en la fisiopatología de algunas enfermedades neurodegenerativas, la esclerosis lateral amiotrófica es un ejemplo de ello (Spalloni et al. 2013).

III. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

La ELA es una enfermedad del sistema nervioso, caracterizada por la degeneración progresiva de las motoneuronas en la corteza cerebral (neuronas motoras superiores), tronco encefálico y médula espinal (neuronas motoras inferiores). Hasta la fecha, se trata de una patología incurable y de carácter fatal tras su diagnóstico en un plazo de entre 3 y 5 años; habitualmente el paciente fallece por insuficiencia respiratoria. Cabe mencionar que sólo en el 10% de los casos la supervivencia supera los 5 años tras el diagnóstico. Existen casos en los que se ha observado una supervivencia significativamente diferente a la mayoría de los pacientes, lo que pondría de manifiesto el posible diagnóstico erróneo de algunos casos que en principio fueron clasificados como casos de ELA. En esta enfermedad, la autonomía motora, la comunicación oral, la deglución y la respiración, se ven comprometidas. La parálisis muscular que lleva consigo asociada conduce a una incapacidad con la completa preservación de las funciones mentales, la sensibilidad, la motilidad ocular y el control de los esfínteres (Grupo de trabajo de la Guía Asistencial de Esclerosis Lateral Amiotrófica 2012).

Esta enfermedad es también conocida como la enfermedad de Charcot, neurólogo pionero en el diagnóstico de la misma entre los años 1865 y 1874, o también conocida como la enfermedad de Lou Gehrig, jugador de béisbol estadounidense diagnosticado con esta enfermedad. Este neurólogo francés, Dr. Jean-Martin Charcot, la describió como una enfermedad esporádica del adulto, resultado de la degeneración progresiva idiopática del sistema neuronal motor, abarcando tanto las motoneuronas superiores en la corteza motora y sus proyecciones corticobulbares y corticoespinales, como las motoneuronas inferiores y sus proyecciones en troncos nerviosos periféricos. Todo ello provocaría debilidad y atrofia muscular generalizada, progresiva y rápida, que

frecuentemente acaban en la muerte (Charcot & Joffroy 1869). En el año 1874, Charcot, utiliza el término ELA por primera vez, otorgó dicho nombre a la enfermedad haciendo referencia al endurecimiento de las columnas laterales de la médula espinal, palpable en autopsia (esclerosis lateral) y a la atrofia muscular por afectación de las motoneuronas inferiores que se ve acompañada de debilidad y fasciculaciones por la gran pérdida de masa muscular (amiotrófica). En 1933, Brain introdujo el término *enfermedad de la neurona motora*, englobando así los diferentes cuadros clínicos observados hasta la fecha en los que había afectación de las estructuras del sistema motor, y propuso que todas estas entidades podían llegar a agruparse como una única enfermedad (Russell Brain 1933). La ELA se incluye entre las llamadas enfermedades de la neurona motora (MND, del inglés *motor neuron disease*) tras la descripción de Brain y Walton en 1969 (Rowland 2001).

1. Epidemiología y clínica de la ELA

A mediados del siglo XX se publicaron los primeros estudios epidemiológicos sobre una enfermedad caracterizada por la combinación de demencia, parkinsonismo y ELA en la población nativa de la isla de Guam, isla donde la incidencia de ELA era 50 – 150 veces superior al resto del mundo. Ese hecho despertó gran interés por parte de los investigadores, ya que permitía estudiar la ELA desde otra perspectiva (Kurland & Mulder 1954). La ELA es una de las enfermedades neurodegenerativas con mayor importancia junto a la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. Son múltiples los estudios epidemiológicos publicados referentes a la ELA. En general ponen de manifiesto una incidencia que oscila entre 1 - 2 casos por cada 100.000 habitantes al año, superándose dichas cifras en las áreas de alta incidencia (isla de Guam, península de Kii, población de Irian Jaya, tribu de Anguru en Australia o la población de Guadalupe en el Caribe) (Camacho et al. 2015).

La prevalencia de esta enfermedad es baja debido a la alta mortalidad que lleva consigo asociada; los estudios publicados muestran, en general, valores de 2 - 5 casos por cada 100.000 habitantes. Esta patología es algo más frecuente en hombres que en mujeres, la relación aproximada hombre: mujer es de 1.5:1 (Camacho et al. 2015; Lokesh C Wijesekera & Leigh 2009). La edad media de inicio de la enfermedad oscila entre los 55 y los 65 años aproximadamente; sin embargo, los casos de ELA con origen hereditario presentan un inicio a edades más tempranas, unos 10 años antes en muchas ocasiones. El inicio suele ser en su mayoría espinal y en menor medida, aproximadamente en 1/3 de los casos, se inicia con síntomas bulbares.

En la ELA se observa una degeneración progresiva del sistema neuronal motor, afectando como consecuencia a la musculatura esquelética. Las características clínicas propias de la ELA son las correspondientes a la pérdida de función de las motoneuronas inferiores y superiores a diferentes niveles, en función de la fase de la enfermedad (Mora 2011). La ELA se caracteriza por cursar con síntomas y signos de afectación de primera y segunda motoneurona. En los casos de inicio bulbar la supervivencia media suele ser de unos 2-3 años, mientras que en los casos de inicio espinal es de unos 3-5 años aproximadamente (L C Wijesekera & Leigh 2009).

Entre los signos de afectación de primera motoneurona o motoneurona superior encontramos: pérdida de destreza, pérdida de fuerza muscular (debilidad), aumento del tono o espasticidad, exaltación de reflejos de estiramiento muscular o hiperreflexia patológica, reflejos patológicos, exaltación de reflejos en una extremidad atrófica, parálisis pseudobulbar (espástica) y labilidad emocional (Grupo de trabajo de la Guía Asistencial de Esclerosis Lateral Amiotrófica 2012). El habla también es lenta y esforzada, hay labilidad emocional y el reflejo mentoniano es acusado (Mora 2011).

Por otra parte, si nos centramos en los signos de afectación de segunda motoneurona o motoneurona inferior, destacamos: pérdida de fuerza muscular (debilidad), atrofia muscular, hiporreflexia, hipotonía muscular o flaccidez, fasciculaciones, calambres musculares y síndrome bulbar (Grupo de trabajo de la Guía Asistencial de Esclerosis Lateral Amiotrófica 2012). El habla aparece distorsionada, con lengua débil y atrofiada (Mora 2011).

2. Diagnóstico de ELA

Los estadios iniciales de la ELA no responden a un patrón clínico único y definido, sino que se caracterizan por una gran variabilidad clínica. Este hecho, sumado a la ausencia de biomarcadores biológicos, complica en gran medida un diagnóstico con certeza de forma precoz (Caballero-Hernandez et al. 2015). Por esta razón, se han establecido criterios diagnósticos basados en la presencia de determinados signos clínicos, que permiten una aproximación hacia el diagnóstico diferencial de la misma.

En 1990, la Federación Mundial de Neurología, reunida en El Escorial (Madrid), creó una serie de criterios para el diagnóstico de esta enfermedad, conocidos como “Criterios de *El Escorial*”. Estos criterios, que fueron reevaluados en el año 2000 (Brooks et al. 2000), han permitido una mayor uniformidad en el diagnóstico, aspecto fundamental en los estudios epidemiológicos, fisiopatológicos y en los ensayos de nuevas terapias. Para el diagnóstico de la ELA se deben cumplir todos los criterios A y B de la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios diagnósticos de ELA. Adaptación de la Guía Asistencial de Esclerosis Lateral Amiotrófica (Grupo de trabajo de la Guía Asistencial de Esclerosis Lateral Amiotrófica 2012).

A. PRESENCIA DE
A1: Signos clínicos, electrofisiológicos o neuropatológicos de MNI
A2: Signos clínicos de MNS
A3: Progresión de signos o síntomas en una misma región o a otras regiones, determinado por anamnesis o exploración
B. AUSENCIA DE
B1: Signos electrofisiológicos o anatomopatológicos compatibles con otro proceso capaz de producir degeneración de MNS y/o MNI
B2: Hallazgos en la neuroimagen que puedan explicar los signos clínicos y electrofisiológicos observados

MNI (motoneurona inferior); MNS (motoneurona superior)

Mediante los “Criterios de *El Escorial*”, se establecen cuatro grados de certeza diagnóstica: 1) ELA clínicamente definida, 2) ELA clínicamente probable, 3) ELA clínicamente probable apoyada por exámenes complementarios, y 4) ELA clínicamente posible. En el documento original publicado en 1994 aparecía una quinta categoría: sospecha de ELA, pacientes con signos de motoneurona inferior y en ausencia de signos de motoneurona superior. Estos criterios se utilizan para la inclusión de pacientes en ensayos clínicos, a pesar de que no son muy sensibles en el diagnóstico de las fases iniciales de esta patología. Por otra parte, la Federación Europea de Sociedades Neurológicas, EFNS, establece que no es recomendable el uso de estos criterios en la práctica clínica asistencial (Grupo de trabajo de la Guía Asistencial de Esclerosis Lateral Amiotrófica 2012). Estos criterios han sido posteriormente revisados y actualizados (de Carvalho et al. 2008; Schrooten et al. 2011).

El avance de esta enfermedad, en la mayoría de los casos, es rápido e impredecible, progresando hasta el fallo respiratorio y la muerte como consecuencia final. Las funciones bulbares se ven altamente afectadas (capacidad de hablar y deglución) (Roche et al. 2012). Los pacientes también presentan contracciones involuntarias de grupos de fibras musculares (fasciculaciones), debilidad y pérdida de masa muscular (Kiernan et al. 2011).

Es importante destacar la asociación entre ELA y demencia frontotemporal (DFT). Con frecuencia, el déficit cognitivo asociado a los pacientes de ELA pasa inadvertido y no se hace un diagnóstico exhaustivo del mismo. Sin embargo, al realizar las evaluaciones neuropsicológicas adecuadas se comprueba que entre el 20 y el 50% de los pacientes con ELA cumplen criterios de DFT probable o definida (Ringholz et al. 2005). En el año 2006, Neumann y sus colaboradores, identificaron en neuronas tanto de pacientes con ELA esporádica como de pacientes con DFT, inclusiones citoplasmáticas positivas para ubiquitina. Dichas inclusiones contenían también una proteína llamada TDP-43 (Neumann et al. 2006). Años después se demostró que mutaciones en el gen que codifica a dicha proteína, en el gen *TARDBP* (del inglés *transactive response DNA binding protein*), tienen como consecuencia el desarrollo de ELA (Neumann et al. 2006; Sreedharan et al. 2008; Kabashi et al. 2008). Existe otra proteína que parece estar asociada a ambas patologías, la proteína FUS, funcionalmente relacionada con TDP-43 (Caballero-Hernandez et al. 2015). Se ha demostrado que mutaciones en el gen que codifica a la proteína FUS (del inglés *fused in sarcoma*) son también causa de casos de ELA familiar, y curiosamente, también se han hallado inclusiones de esta proteína en cerebros de pacientes con DFT (Kwiatkowski et al. 2009; Loy et al. 2010). Recientemente se ha identificado la expansión de seis nucleótidos de secuencia "GGGGCC" en el gen *C9ORF72*, asociada tanto al desarrollo de ELA como al desarrollo de DFT (Renton et al.

2011; M DeJesus-Hernandez et al. 2011). Estos hallazgos han aumentado enormemente el interés por el estudio de la patogenia común a estas enfermedades.

Existe una variante de la ELA conocida como 'ELA juvenil', término que se emplea en los casos en los que el inicio tiene lugar antes de los 25 años de edad. Estos casos suelen tener una supervivencia prolongada. La ELA juvenil puede ser esporádica o familiar (Ben Hamida et al. 1990).

3. Tratamientos en ELA

A pesar de los intensos esfuerzos de investigación en la materia, los mecanismos causantes de la ELA permanecen poco claros. Actualmente, no existen tratamientos efectivos para la misma, siendo una prioridad la obtención de datos preclínicos que sustenten estudios clínicos para el establecimiento de terapias modificadoras del progreso de la enfermedad. Sin embargo, son muchos los estudios desarrollados con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes y prolongar sus posibilidades de supervivencia. Los avances obtenidos a nivel de la etiopatogenia de la enfermedad han ampliado el campo de estudio con el fin de obtener alternativas terapéuticas. Las investigaciones sobre tratamientos etiopatogénicos van dirigidas a buscar fármacos que actúen sobre los procesos implicados en la degeneración de la motoneurona.

En este sentido, el único fármaco actualmente aprobado para el tratamiento de la ELA es el riluzol (Rilutek®), que fue aprobado por la FDA en 1996. Si bien no se conoce completamente el mecanismo de acción del riluzol, se sabe que una de las vías por las que actúa consiste en reducir la liberación presináptica de glutamato a través de los canales de sodio, prolongando de este modo la supervivencia de los pacientes y de animales modelo para el estudio de esta enfermedad, como es el caso del ratón transgénico SOD1 (Bento-Abreu et al.

2010; Ferraiuolo et al. 2011; Miller et al. 2007). Se realizaron dos ensayos clínicos multicéntricos, uno europeo y otro norteamericano, estratificados, aleatorizados, con placebo y controlados. En ambos estudios se observó un aumento de la supervivencia de 6 meses (100 mg/día) y una mortalidad un 38,6% inferior a los 12 meses en el grupo tratado, en comparación con el no tratado, diferencia que se mantuvo hasta los 21 meses (Grupo de trabajo de la Guía Asistencial de Esclerosis Lateral Amiotrófica 2012).

Aunque existen otros principios activos antiglutamato, como la gabapentina, la lamotrigina, el topiramato y el talampanel, que no han mostrado ser efectivos en ensayos clínicos (Siciliano et al. 2010), el Riluzol® es el único tratamiento antiexcitotoxicidad que ha demostrado alargar la supervivencia de los pacientes con ELA. Si bien no se conoce al completo la razón de esta diferencia, una posible explicación podría ser que el Riluzol® presenta múltiples efectos neuroprotectores (Cheah et al. 2010).

Los pacientes con ELA presentan una serie de signos y síntomas característicos que deben ser identificados y tratados de forma específica, entre ellos: sialorrea (exceso de saliva), dolor, calambres, espasticidad, labilidad emocional, depresión, alteraciones del sueño, estreñimiento y trombosis venosa. El tratamiento sintomático de los pacientes permite, en la medida de lo posible, mejorar su calidad de vida.

4. Fisiopatología ELA

A nivel celular, La ELA se caracteriza por la degeneración y muerte de motoneuronas superiores e inferiores en la corteza motora, el tallo cerebral y la médula espinal. Los casos diagnosticados de ELA se dividen en dos tipos fundamentalmente atendiendo a si existen o no antecedentes familiares: a) ELA familiar (hereditaria, engloba entre el 5 y el 10% de los casos de ELA, aunque

este porcentaje puede estar infravalorado), y b) ELA esporádica, que componen la mayor proporción de los casos de ELA. Sin embargo, fenotípicamente no son evidentes las diferencias observadas entre los casos de ELA familiar y esporádica.

Hay identificados muchos genes relacionados con los casos de ELA familiar, y adicionalmente, varios polimorfismos parecen estar ligados a un incremento en el riesgo de desarrollar una ELA esporádica. Aproximadamente el 20% de los casos de ELA familiar se deben a una mutación en el gen de la enzima superóxido dismutasa tipo 1 (*SOD1*) (Rosen et al. 1993), y generalmente presenta herencia autosómica dominante. Existen más de 150 mutaciones descritas en *SOD1* asociadas al desarrollo de ELA. Esta enzima pertenece al grupo de las llamadas, metaloenzimas Cu/Zn (cobre/zinc). Está implicada en la eliminación de radicales libres, convirtiendo aniones superóxido en peróxido de hidrógeno. Avances en el estudio de las bases genéticas de los casos de ELA familiar han permitido descubrir otros genes implicados en el desarrollo de esta patología (Siddique & Ajroud-Driss 2011), entre ellos: *TARDBP* (Neumann et al. 2006), *VAPB* (del inglés *vessicle associated membrane protein B*), *FUS* (Kwiatkowski et al. 2009), *C9ORF72* (del inglés *chromosome 9 open reading frame 72*) (Renton et al. 2011; M DeJesus-Hernandez et al. 2011), *UBQLN2* (del inglés *ubiquilin 2*) (Deng et al. 2012), *HNRNPA1* y *HNRNPA2B1* (del inglés *hetero-geneous nuclear ribonucleoproteins A1 y A2/B1*) (Kim et al. 2013), del cual se desconoce en gran medida el papel que desempeña (Le Ber et al. 2014) (Figura 3).

Es importante destacar que la identificación de agregados proteicos anormales en pacientes de ELA ha dado pie a la identificación de mutaciones relacionadas con el desarrollo de la enfermedad. Un ejemplo de ello es el caso de las mutaciones asociadas al gen *TARDBP* (Kabashi et al. 2008; Sreedharan et al.

2008), que fueron identificadas a raíz del hallazgo de inclusiones proteicas de TDP-43 en neurona y en células gliales en la médula espinal de pacientes con ELA (Arai et al. 2006), las cuales han sido halladas tanto en casos de ELA familiar como en casos de ELA esporádica. En pacientes con ELA, además de encontrarse formando inclusiones, los agregados de TDP-43 están presentes a nivel citosólico, en vez de en el núcleo, donde se halla en condiciones fisiológicas (Pokrishevsky et al. 2012).

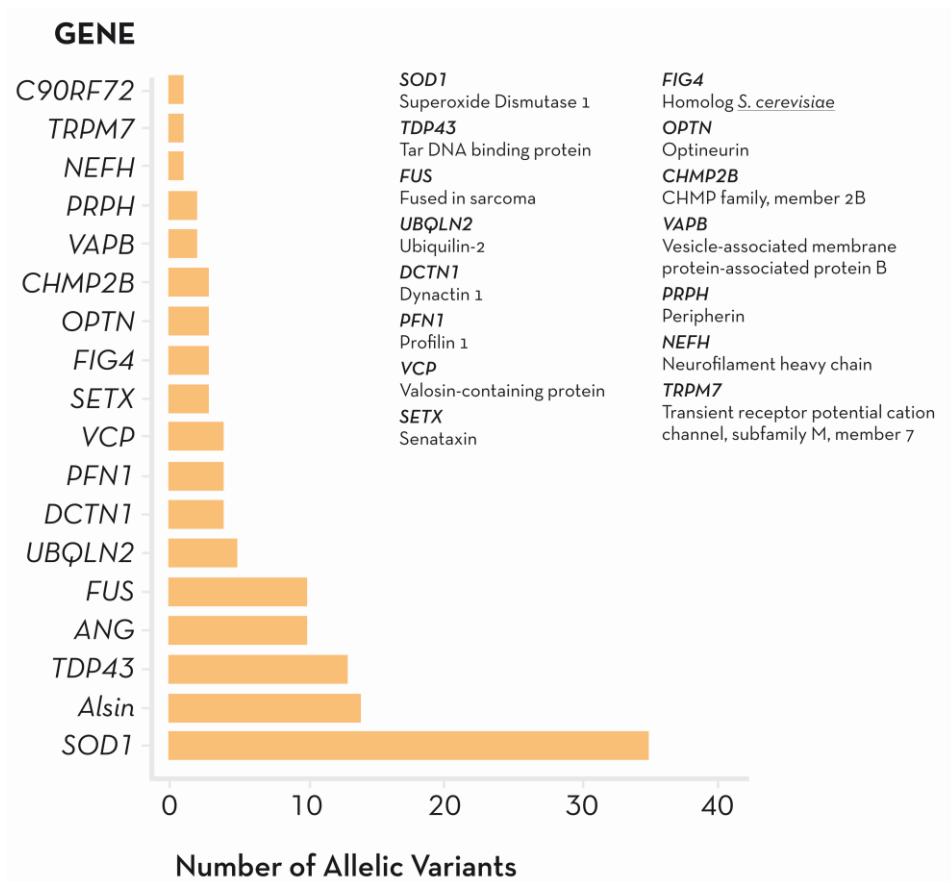


Figura 4. Variantes alélicas asociadas a pacientes de ELA. Se representan las variantes alélicas descritas hasta la fecha en genes mutados de pacientes con ELA. Los datos fueron obtenidos de la base de datos *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM)

(*National Library of Medicine and Johns Hopkins University*) (Caballero-Hernandez et al. 2015).

Estudios realizados demostraron que en muchas ocasiones la DFT y la ELA se heredaban conjuntamente (Orr 2011). Este hecho dio lugar a otro de los grandes hallazgos en la genética de la ELA, el descubrimiento la expansión de seis nucleótidos de secuencia “GGGGCC” en el gen *C9ORF72*, localizado en la región no codificante del cromosoma 9. Este descubrimiento fue realizado por parte de dos grupos de forma independiente (Renton et al. 2011; M DeJesus-Hernandez et al. 2011). La importancia de este hallazgo radica en que esta mutación se encuentra en el 25-40% de los casos de ELA familiar.

De este conjunto de datos, y de las investigaciones preclínicas y clínicas llevadas a cabo, la comunidad científica establece que tanto la etiología como la fisiopatología de la ELA es multifactorial, involucrando a un número diverso de tipos celulares y potenciales mecanismos de acción que conllevan una reducción funcional de la actividad motora. Son múltiples las hipótesis patogénicas asociadas a la ELA, entre ellas podemos destacar:

4.1. Excitotoxicidad

Se conoce como excitotoxicidad al proceso por el cual aminoácidos neuromoduladores como el glutamato alcanzan concentraciones superiores a las fisiológicas en el espacio postsináptico, las cuales llegan a ser tóxicas y producen lesiones neuronales. Este hecho se debe a la sobreactivación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos, provocando alteración en la homeostasis de calcio y una excesiva producción de radicales libres, siendo las motoneuronas particularmente sensibles a esta toxicidad (Mora 2011). El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC, se une a

receptores ionotrópicos tales como receptores de NMDA y receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (receptores AMPA) de la membrana postsináptica. Una excesiva activación de estos receptores por parte del glutamato puede dar lugar a un proceso excitotóxico e inducir cascadas enzimáticas calcio-dependientes que tienen como resultado final la inducción de neurodegeneración por apoptosis (Kiernan et al. 2011).

4.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo causa daño estructural y cambios en la señalización sensible al estado redox, surgiendo un desequilibrio entre la generación y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y/o una reducción en la capacidad del sistema biológico para eliminar o reparar el daño inducido por ROS. Cuando este hecho ocurre en neuronas durante el proceso de envejecimiento, se puede modificar la respuesta frente a un factor tóxico como puede ser la presencia de una mutación que predisponga a padecer una enfermedad determinada debido al daño neuronal y la posterior neurodegeneración asociada. Cabe resaltar este hecho en el caso de la ELA, donde se ha demostrado el efecto de estrés oxidativo sobre la progresión de la enfermedad; de hecho, un 20% de los casos de ELA familiar se deben a mutaciones en SOD1, responsable de codificar múltiples proteínas antioxidantes (Rosen et al. 1993). Existen estudios que demuestran un incremento en los marcadores de daño por radicales libres en muestras de LCR, suero y orina de pacientes de ELA (Smith et al. 1998; Simpson et al. 2004; Mitsumoto et al. 2008). Además, se ha demostrado ampliamente que en muestras post-mortem de tejido de pacientes con ELA esporádica o familiar asociada a mutaciones en SOD1, se aprecia daño oxidativo a proteínas, lípidos y ADN. Más aún, este daño oxidativo también se observa en modelos celulares y animales de ELA (Ferraiuolo et al. 2011).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo afecta, y en ocasiones exacerba, otras vías fisiopatológicas que contribuyen al daño de las motoneuronas, entre ellas la excitotoxicidad, el fallo mitocondrial, la agregación de proteínas, el estrés del retículo endoplasmático y la alteración de la señalización mediada por astrocitos y microglía.

4.3. Daño en el transporte axonal

Las neuronas motoras son células muy polarizadas con axones de gran longitud. El transporte axonal es fundamental para liberación de componentes esenciales como ARN, proteínas y orgánulos al compartimento axonal, el cual incluye las estructuras sinápticas de la unión neuromuscular. Dicho transporte ocurre en dos direcciones, anterógrado, desde el soma neuronal hasta el telodendrón, y retrógrado, desde los botones terminales hasta el soma neuronal; la maquinaria celular responsable del mismo implica, respectivamente, las moléculas de kinesina dependientes de microtúbulos y las moléculas de dineína citoplasmática (Kieran et al. 2005). Existen estudios que demuestran un fallo en el transporte axonal en fases iniciales de la enfermedad en el modelo animal SOD1, apoyando la hipótesis de la implicación del daño axonal en la fisiopatología de la ELA. Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce dicho fallo no se conoce aún al completo (Kieran et al. 2005; De Vos et al. 2007; Williamson & Cleveland 1999).

4.4. Disfunción mitocondrial

Son múltiples las evidencias que demuestran la implicación de la mitocondria en la ELA. Sin embargo, no se conoce en detalle el mecanismo adscrito al efecto que la disfunción mitocondrial presenta en el contexto de la degeneración de las motoneuronas durante la ELA, a pesar de que sí se sabe que la mitocondria

juega un papel fundamental en la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la apoptosis (Dupuis et al. 2004). Se han observado anomalías mitocondriales significativas, tanto a nivel morfológico como funcional, en pacientes de ELA y en modelos animales empleados en el estudio de la enfermedad (Duffy et al. 2011). Es importante mencionar que la disfunción mitocondrial observada en ELA no se restringe a neuronas motoras, se observa también en otros tejidos, especialmente en el músculo esquelético (Dupuis et al. 2004).

La mitocondria participa tanto en la producción de energía intracelular, como en la homeostasis del calcio, en la generación regulada de radicales libres, constituyendo el lugar principal de generación de especies reactivas de oxígeno, y en el control de la apoptosis. Cabe destacar que la excitotoxicidad por glutamato provoca daño mitocondrial y que la alteración del transporte axonal perturba el tránsito normal de las mitocondrias a través del axón, estando este hecho relacionado con la eficacia de la producción bioenergética de dicho orgánulo (Dupuis et al. 2004). Las neuronas motoras son especialmente sensibles a la pérdida de la función mitocondrial, debido a su alta carga metabólica y su consecuente dependencia de la fosforilación oxidativa (Duffy et al. 2011). Algunos estudios describen un fallo en la cadena respiratoria mitocondrial debido al estrés oxidativo, tanto en pacientes con ELA como en el modelo animal SOD1. Este fallo en la regulación del metabolismo energético parece contribuir a la disfunción de las neuronas motoras en el contexto de la ELA (Wiedemann et al. 2002; Mattiazzi et al. 2002). Todo ello apoyaría tres de las hipótesis de patogenicidad asociadas con la ELA, y le otorgaría a la mitocondria un papel importante como causa y/o consecuencia del proceso patológico.

4.5. Agregación de proteínas

Muchos trastornos neurodegenerativos se caracterizan por un plegamiento anómalo y la consecuente agregación de ciertas proteínas intracelulares, un ejemplo de ello serían los cuerpos de Lewy con α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson. En el caso de la ELA esporádica se han detectado agregados de TDP-43, ribonucleoproteína que puede unirse al ADN, ARN y a otras proteínas. La TDP-43 en condiciones normales se localiza en el núcleo, y tiene un papel fundamental en la regulación de la transcripción y maduración alternativa, procesamiento y transporte de ARN. En algunos casos de ELA esporádica se han identificado también agregados de la proteína FUS, proteína de unión a ADN y ARN cuya localización principal es nuclear, como ocurría en el caso de la TDP-43. No se conoce al completo la función de la proteína FUS, pero se sabe que está implicada en el metabolismo de ARN y en la regulación de la transcripción. Es importante mencionar que en los casos familiares de ELA debidos a mutaciones en SOD1, FUS o TDP-43, los agregados proteicos están constituidos por SOD1, FUS y TDP-43 mutadas, respectivamente (Mackenzie et al. 2010; Deng et al. 2011).

4.6. Desregulación del sistema inmunitario en la ELA: Neuroinflamación

El sistema inmunitario se encuentra estrechamente vinculado con muchas enfermedades neurodegenerativas, siendo la ELA un ejemplo de ello (Amor et al. 2010; Amor et al. 2014). Se ha demostrado que tanto en sangre periférica como en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de ELA existe activación del sistema inmunitario (Amor et al. 2014). La neuroinflamación es una característica común a muchas enfermedades neurodegenerativas. En el caso de la ELA, el hallazgo de microglía activada y de infiltración linfocitaria en el SNC, muestra que la inflamación tiene un papel importante en la fisiopatología

de la enfermedad (Zhao, David R Beers, et al. 2013). Se cree que en las fases tempranas de la ELA el sistema inmunitario juega un papel beneficioso, promoviendo la reparación neuronal en las zonas dañadas. Sin embargo, a medida que avanza la enfermedad se ha observado que las células T activadas tienen efecto deletéreo (Zhao, David R Beers, et al. 2013). Los estudios sobre la respuesta inmunitaria asociada a esta enfermedad han permitido un mejor entendimiento de los eventos asociados a la pérdida de neuronas motoras y representan un potente campo de potenciales biomarcadores para dicha patología.

4.6.1. Glía: Astrocitos y microglía

Se ha descrito que en la ELA, las células residentes del sistema inmunitario innato, entre ellas las células microgliales y los astrocitos, interaccionan entre sí de forma dinámica. Este proceso se vuelve nocivo para las neuronas motoras, dando pie a la progresión de la enfermedad. Estudios neuropatológicos realizados postmortem sobre pacientes de ELA han demostrado que en el SNC existe microglía activada, concretamente en las zonas donde ha tenido lugar el daño neuronal (Brettschneider et al. 2012).

Algunas quimioquinas, como es el caso de la quimioquina quimioatrayente de monocitos (CCL2 o MCP-1), se encuentran sobreexpresadas en la médula espinal de ratones SOD1 mutantes y de pacientes de ELA (Henkel et al. 2004; Henkel et al. 2006). Del mismo modo, el factor estimulante de colonias (CSF1) se encuentra aumentado en médula espinal de ratones SOD1 transgénicos (Elliott 2001). Dichos factores pueden contribuir a activar la microglía y a estimular su proliferación.

La microglía presenta un papel dual en el proceso neurodegenerativo, tanto con efectos neuroprotectores como neurotóxicos. Existen estudios que

demuestran que este hecho se ve altamente influenciado por las interacciones con el entorno. En el año 2009 se publicaron dos estudios que ponían de manifiesto este papel dual. Uno de ellos consistió en el tratamiento con CSF-1 de ratones SOD1 mutantes donde se encontró un aumento de la proliferación de la microglía y de la expresión de citoquinas proinflamatorias y fagocíticas que aceleró la progresión de la enfermedad en el modelo (Gowing et al. 2009). El segundo estudio se realizó sobre el modelo animal transgénico de la enfermedad de Alzheimer, APP (Swe)/PS1, donde el tratamiento con CSF1 tuvo como resultado la disminución del tamaño y de la densidad de las placas β -amiloides y una reducción de la pérdida cognitiva, resultado de la neuroprotección inducida (Boisssonneault et al. 2008).

Existen trabajos cuyos resultados ponen de manifiesto el aumento de mediadores proinflamatorios observado en pacientes de ELA en comparación con controles sin patología conocida, un ejemplo de ello sería el estudio realizado en 2009 por Kuhle y sus colaboradores, donde demostraron que los niveles de IL-8 y de MPC-1 se encuentran aumentados en el LCR de pacientes de ELA (Kuhle et al. 2009), y el estudio en el que detectan alterados los niveles de mediadores inflamatorios en muestras de sangre de pacientes con ELA esporádica (Mantovani et al. 2009). En particular, Mantovani y colaboradores observaron: i) niveles aumentados de células T CD4+ y niveles reducidos de células T CD8+, asociados a una reducción de la expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl-2; ii) niveles reducidos de células T reguladoras CD4+ CD25+ y de monocitos (CD14+) en pacientes en las fases menos severas de la enfermedad, sugiriendo que dichas células pudieran estar siendo reclutadas por el SNC en la zona donde acontece el proceso neurodegenerativo inicial, con el fin de modular la respuesta inmunitaria e inducir efectos neuroprotectores; iii) niveles reducidos de expresión de marcadores de activación en monocitos (Mantovani

et al. 2009). Todo ello apoyaría el hecho de que en los pacientes con ELA esporádica existe alteración de la homeostasis inmunitaria a nivel de las células mononucleares de sangre periférica, y sugiere la implicación de la respuesta inmunitaria adaptativa, además de la innata, en el proceso neuroinflamatorio asociado a la fisiopatología de la ELA.

Estudios recientes sugieren el papel dual de la microglía en el contexto de ciertas enfermedades neurodegenerativas. Las células microgliales presentan un efecto neuroprotector sobre las neuronas motoras en las fases iniciales de proceso patológico. Sin embargo, la sostenida activación de la microglía tiene como consecuencia la secreción de factores neurotóxicos, contribuyendo así a la muerte de neuronas motoras. Cabe señalar que no se conoce por completo el mecanismo adscrito a este proceso (Revisado en (Brites & Vaz 2014) (Figura 4). Por otra parte, se debe mencionar el papel dual asociado también a los astrocitos en el contexto de la ELA. Se les otorgan efectos neuroprotectores, promoviendo la retirada de glutamato, y neurotóxicos, induciendo la respuesta proinflamatoria, sobre las motoneuronas; siendo capaces de modificar el curso de la enfermedad (Vargas & Johnson 2010) (Revisado en (Brites & Vaz 2014). Como se ha comentado anteriormente, la respuesta inflamatoria es una característica patológica de la ELA. Esta respuesta no es sólo consecuencia de la degeneración de las neuronas motoras, sino que contribuye activamente al mantenimiento del equilibrio entre la neuroprotección y la neurotoxicidad. Se cree que la infiltración inicial de linfocitos y microglía ralentiza el curso de la enfermedad; sin embargo, a medida que avanza la enfermedad, se ha visto que ésta acaba teniendo un efecto perjudicial (Moisse & Strong 2006; Sta et al. 2011).

Las células gliales, entre ellas células microgliales y astrocitos, contribuyen en el mantenimiento de la homeostasis neuronal. Se ha observado que en ELA

existen células inmunitarias que se activan en respuesta a un estímulo inicial como pueden ser los agregados proteicos asociados a esta patología (Xu et al. 2012; Neumann et al. 2006). En la ELA, así como en otras patologías del SNC, existen las llamadas señales de estrés endógeno, denominadas patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs); un ejemplo de ello sería el anormal plegamiento y la agregación aberrante de determinadas proteínas, lo que puede actuar como desencadenante del proceso inflamatorio. Estos DAMPs pueden inducir respuestas inmunitarias mediadas por los PRPs. Existen estudios que muestran el papel que determinados DAMPs juegan en el contexto de la ELA. Entre dichos DAMPs se encontrarían las especies reactivas de oxígeno y las proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*, HSPs), habiendo sido ambas detectadas en niveles aumentados tanto en médula espinal como en la corteza motora de ratones del modelo SOD1 y de pacientes de ELA (Barber & Shaw 2010; Brown 2007; Bianchi & Manfredi 2009).

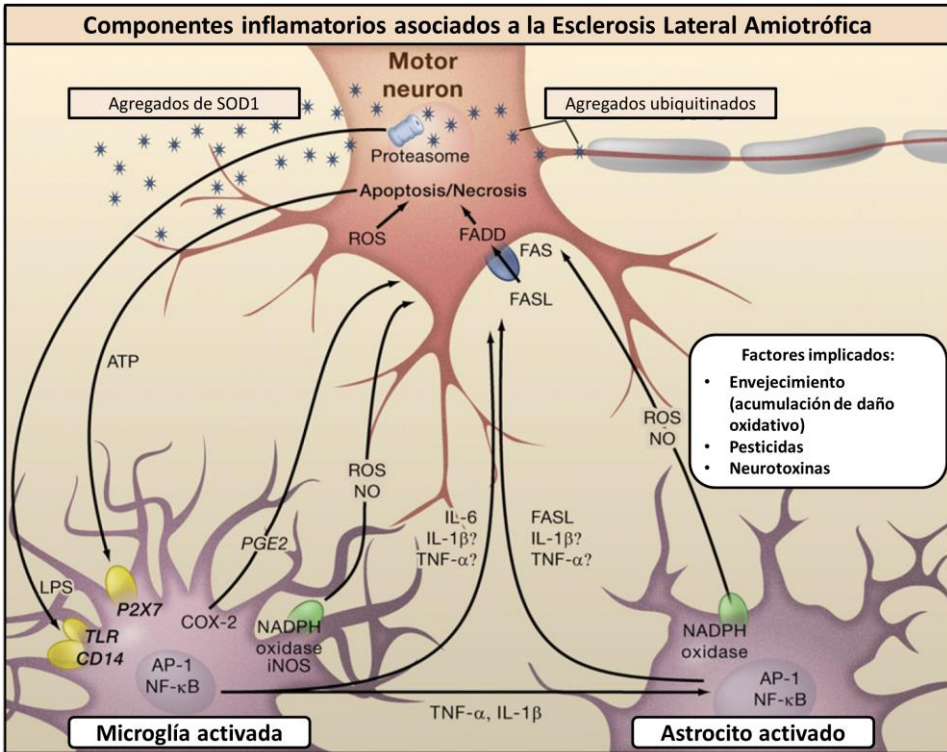


Figura 5. Mediadores inflamatorios asociados a la ELA. La patología de la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se caracteriza por la degeneración de neuronas motoras. Las mutaciones en el gen SOD1 son responsables de parte de los casos de ELA familiar. La progresiva neurodegeneración que acontece en la ELA sería el resultado de la combinación de la vulnerabilidad intrínseca de ciertas neuronas motoras a los agregados de la proteína mutante SOD1 y de la toxicidad derivada de células vecinas circundantes. Los agregados tóxicos pueden inducir respuestas inflamatorias por parte de la microglía mediadas por TLR-2 y CD14. Estas células microgliales pueden inducir la activación de astrocitos mediante la producción de citoquinas. La activación de microglía y astrocitos amplifica el daño inicial asociado a las motoneuronas mediante la activación de AP-1 y NF- κ B. Dicha activación lleva consigo la secreción de citoquinas proinflamatorias y de moléculas inductoras de apoptosis como TNF- α y FASL. TNF- α e IL-1 β ejercen efectos neurotóxicos in vitro; sin embargo, la depleción de los genes individuales no afecta a la evolución de la enfermedad en el modelo animal. El ATP liberado por las motoneuronas dañadas activaría aún más a las células microgliales a

través de los receptores purinérgicos P2X7 expresados en la microglía. Figura adaptada de (Glass et al. 2010).

Es importante resaltar que además de los cambios observados a nivel del SNC, los músculos y nervios periféricos parecen ser también zonas de activación inmunológica implicados en el proceso de la ELA. No se sabe aún si la afectación del cerebro, la médula espinal y los músculos tiene lugar de forma simultánea, o si el proceso fisiopatológico tiene lugar de forma secuencial. Muchos de los mediadores inmunitarios implicados están presentes en múltiples zonas, lo cual podría indicar que actúan como sistemas de comunicación entre los diferentes órganos afectados, estando por tanto involucrados en la propagación del proceso patológico (Malaspina et al. 2014). La transferencia de señales inmunológicas entre el SNC y las uniones neuromusculares, así como el tránsito de mediadores inmunitarios en dirección opuesta, necesita ser facilitada por una barrera hematoencefálica comprometida. Se ha descrito que en modelos animales de ELA, tanto la barrera hematoencefálica como la barrera que separa la sangre periférica de la médula espinal, se encuentran afectadas como consecuencia de la degeneración epitelial asociada a esta patología (Winkler et al. 2013; Zlokovic 2011).

Evidencias publicadas hasta la fecha demuestran que durante el proceso patológico asociado a la ELA, tanto en los tejidos afectados como en sangre periférica, se detectan niveles más altos de determinadas citoquinas, como IL-6 (interleuquina 6), TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante beta 1) e IFN- γ (interferón gamma), entre otras. Se han observado altos niveles de TGF- β 1 en pacientes en fase terminal en comparación con los controles sanos, alcanzando niveles mayores a medida que aumenta la duración de la enfermedad (Houi et al. 2002; Iłzecka et al.

2002). En el caso de los niveles de TNF- α , aún no se ha confirmado una clara correlación en función del momento de progresión de la enfermedad (Beers et al. 2011; Poloni et al. 2000; Tateishi et al. 2010). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que IFN- γ promueve la neurogénesis y la neuroprotección en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer (Baron et al. 2008), y que presenta efecto neuroprotector frente al daño neural derivado de la excitotoxicidad inducida por glutamato (Lee et al. 2006).

Tateishi y colaboradores realizaron un estudio sobre LCR de pacientes con ELA, y que ciertos mediadores se encontraban aumentados en estos pacientes, entre ellos el IFN- γ . Por otra parte, detectaron también niveles reducidos de CXCL10 (proteína inducible por interferón 10). Estas observaciones podrían representar una respuesta protectora asociada al mecanismo neurodegenerativo, resultado de mecanismos de defensa por parte del paciente con ELA (Tateishi et al. 2010). Otro de los marcadores detectado en niveles aumentados en LCR de pacientes de ELA es la quimioquina MCP-1, capaz de atraer células inmunitarias periféricas al LCR. Existen estudios que sugieren una correlación positiva entre los niveles de MCP-1 e IL-18 en fluidos biológicos de pacientes y la rapidez de progresión de la enfermedad (Tateishi et al. 2010; Malaspina et al. 2014).

Han sido muchos los resultados publicados sobre el posible nexo entre infecciones bacterianas sistémicas y el transcurso de la enfermedad en modelos animales de ELA (Ebert et al. 2010; Nguyen et al. 2004). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el reclutamiento de linfocitos T CD8 en el SNC asociado a infecciones periféricas por virus puede conllevar a procesos patológicos en el SNC en los animales estudiados (Matullo et al. 2011). Este hecho refuerza la hipótesis de que los virus no necesitan replicarse en la zona donde tiene lugar el daño neural, sino que la infección sistémica por virus puede

desencadenar también un estado patológico en el SNC (Matullo et al. 2011), lo que sugiere una potencial implicación de infecciones microbianas en la etiología de determinadas enfermedades neurodegenerativas, la ELA entre ellas (De Chiara et al. 2012). En este sentido es importante mencionar que existen estudios que muestran evidencias del papel que los TLRs juegan en el contexto de la ELA y otros desórdenes neurodegenerativos (Drouin-Ouellet & Cicchetti 2012). Por ejemplo, se ha observado un incremento de los niveles de expresión de TLR-2 (Letiembre et al. 2009; Lincecum et al. 2010) y de TLR-7 y TLR-9 (Letiembre et al. 2009) en médula espinal de animales modelo de ELA (SOD1^{G93A}).

Por otra parte, estudios llevados a cabo sobre pacientes con ELA muestran que tanto niveles de expresión de los genes para TLR-2 y TLR-4 como los niveles de las proteínas derivadas, se encuentran aumentados en la médula espinal de dichos pacientes (Casula et al. 2011). Zhang y sus colaboradores, publicaron en el año 2011 un estudio en el que demostraban que tanto en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con ELA como en esplenocitos de animales SOD1^{G93A}, se encontraban aumentados los niveles de expresión de los genes asociados a la cascada de señalización LPS/TLR-4 (Zhang et al. 2011). A pesar de todos estos hallazgos, se precisan más estudios para poder definir el papel que los TLRs tienen en el contexto de la ELA.

4.6.2. Linfocitos

En los últimos años, se ha demostrado que la respuesta neuroinflamatoria asociada a la ELA está estrechamente vinculada a la infiltración de monocitos/macrófagos y células T desde la periferia (Zhao, David R. Beers, et al. 2013; Chiu et al. 2008). Existen evidencias experimentales que avalan la presencia de células T CD8+ y células T CD4+ tanto en los cuernos ventrales de

la médula espinal como en la corteza motora (McGeer & McGeer 2002; Sta et al. 2011).

Estudios llevados a cabo sobre pacientes de ELA en diferentes fases de la enfermedad, demuestran que existen cambios a nivel de la población de células T periféricas (Banerjee et al. 2008; Mantovani et al. 2009). Además de las evidencias experimentales que señalan la presencia de monocitos y macrófagos infiltrados en la médula espinal de animales modelos de ELA, se ha demostrado que los niveles de células T CD4+ y CD8+ están aumentados en la médula espinal de animales del modelo SOD1, y en parénquima cerebral de pacientes con esta enfermedad (Mantovani et al. 2009; Glass et al. 2010). Estas células periféricas infiltradas interaccionarían con la microglía residente, induciendo de este modo la polarización de esta última hacia un fenotipo M2 (protector) o M1 (citotóxico), en función de la fase de progresión de la enfermedad. Se cree que todo ello conlleva al proceso neurodegenerativo, a pesar de existir tanto efectos neuroprotectores como inflamatorios (Evans et al. 2013; Zhao, David R. Beers, et al. 2013). A nivel de la población de células T periféricas es importante mencionar que en la ELA no sólo se ve afectada la proporción de células CD4+/CD8+, sino que también existe una reducción de la población de células T reguladoras (Treg) periféricas respecto a los controles sanos (Henkel et al. 2013). Estudios publicados demuestran que en los pacientes en los que la enfermedad presenta un curso más agresivo, los niveles de Treg en sangre se encuentran disminuidos, sugiriendo que existe un reclutamiento de dichas células desde la periferia hacia el SNC (Henkel et al. 2013; Mantovani et al. 2009; Banerjee et al. 2008). Las Treg fueron en un principio identificadas por ser capaces de suprimir la proliferación y la activación de otros linfocitos T, y por actuar como piezas fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmunitaria (Sakaguchi et al. 2008; Tang & Bluestone 2008;

Sakaguchi et al. 2011). Los efectos supresores de las Treg sobre otros tipos celulares han sido ampliamente documentados (Sakaguchi 2005; Sakaguchi et al. 2008; Avidan et al. 2004; Tiemessen et al. 2007). Sus efectos inmunosupresores implican la reducción de la secreción de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ y TNF- α) y la inhibición de la transcripción del ARNm de IL-2. Al mismo tiempo, las Treg secretan citoquinas antiinflamatorias y factores neurotróficos, promueven el paso de la respuesta Th1 proinflamatoria a la Th2 antiinflamatoria, y atenúan la respuesta tóxica derivada de la microglía. Por todo ello se les asocia un papel importante como participantes en la modulación de la respuesta inflamatoria, incluyendo la respuesta tóxica asociada a la microglía en el SNC (Zhao et al. 2012).

Los estudios desarrollados sobre modelos animales de SOD1 han ayudado a clarificar parte de del papel de la regulación inmunológica durante el transcurso de la enfermedad. Es llamativa la heterogeneidad fisiopatológica observada entre los pacientes de ELA; sin embargo, los modelos animales empleados permiten un patrón predecible de degeneración, siendo por tanto herramientas útiles en el estudio de dicha patología (Bruijn et al. 2004).

En el modelo animal de SOD1 se han observado diferencias entre la región cervical y la lumbar de la médula espinal en cuanto nivel de expresión de factores protectores y antiinflamatorios, entre ellos: IL-4, BDNF y GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía), estando dichos mediadores incrementados en la zona cervical. Sin embargo, cabe destacar que no se han observado diferencias en cuanto a marcadores de toxicidad (TNF- α , IL-1 β y NOX2) entre las regiones lumbares y cervicales del animal. Estos hechos apoyarían los síntomas iniciales que se observan en el modelo, fundamentalmente la afectación de extremidades inferiores. De esta manera, la expresión de factores neurotróficos ayudaría a controlar la respuesta inflamatoria en la región cervical, pero no así

en la zona lumbar (Beers et al. 2011). Se ha observado también un mayor número de microglía fagocítica en la región cervical en el momento de inicio de los síntomas, en el caso de las células dendríticas, siendo los niveles superiores en la zona lumbar con el subsiguiente incremento de citoquinas Th1 (IFN- γ e IL-6) a medida que progresa la enfermedad (Aebischer et al. 2012). Estos hallazgos refuerzan la importancia del mantenimiento del equilibrio entre respuestas inmunitarias protectora/perjudicial en la modulación del transcurso de la ELA, y sugieren que la diferencia observada entre las regiones cervical y lumbar de la médula espinal en el modelo SOD1 puede explicarse en parte por el incremento de mediadores inmunoprotectores en la región cervical de la médula espinal, y la depleción de los mismos a nivel lumbar. La expresión de factores neurotróficos mitigaría la respuesta proinflamatoria a nivel cervical pero no en la región lumbar. Como se mencionó anteriormente, todo ello se correlacionaría con los primeros síntomas observados en el animal, es decir la paresia de las extremidades inferiores (Beers et al. 2011).

Existe controversia en relación al papel que los linfocitos B desempeñan en el contexto de la ELA. Algunos autores han sugerido que la degeneración de las neuronas motoras se debe a una respuesta autoinmunitaria (Appel et al. 1995; Smith et al. 1996). Varios estudios publicados demuestran la presencia de autoanticuerpos en pacientes con ELA y en el modelo SOD1^{G93A} (Naor et al. 2009; Niebroj-Dobosz & Janik 1999; Offen et al. 1998). Ejemplo de ello es el estudio llevado a cabo por Naor y colaboradores (Naor et al. 2009). Estos autores demuestran la presencia de dichos autoanticuerpos en el modelo animal. Sin embargo, defienden que parece ser que los linfocitos B no juegan un papel esencial en el contexto de los casos de ELA asociados a mutaciones en el gen *SOD1*, ya que realizan un estudio *in vivo* sobre el modelo SOD1^{G93A}, en el que comprueban que animales carentes de linfocitos B son capaces de

desarrollar un proceso patológico análogo al observado en los animales SOD1^{G93A} empleados como control (Naor et al. 2009). En este sentido es importante mencionar que un estudio similar fue llevado a cabo en el modelo EAE para el estudio de la EM (Dittel et al. 2000), y la situación actual revoca la conclusión del mismo, ya que se ha comprobado que en pacientes de EM la depleción de linfocitos B es una terapia exitosa (Hauser et al. 2008). En relación al estudio llevado a cabo por Naor y colaboradores, cabe mencionar que el modelo SOD1^{G93A} representa una minoría del total de los casos de ELA en humanos. Estudios recientes demuestran también la presencia de autoanticuerpos frente a la proteína de membrana LRP4 en suero y LCR de pacientes con ELA. Se sabe que LRP4 tiene un papel fundamental en el desarrollo y la función de las motoneuronas (Tzartos et al. 2014). Dada la existencia de una inflamación local sostenida en la ELA, no es de extrañar que se produzcan fenómenos de rotura de la tolerancia inmunológica cuya importancia relativa en la fisiopatología de la ELA está aún por determinar. De hecho, si bien existe evidencia de respuesta autoinmune en la forma de autoanticuerpos, no existe evidencia de que esta respuesta sea relevante para la iniciación o progresión del ELA.

En resumen, aunque la muerte de neuronas motoras es responsable de la ELA, durante los últimos tres años se ha hecho evidente que la ELA no es un fenómeno autónomo de las mismas; existen otros factores implicados, entre los que destacan la activación de la microglía, infiltración de células T, y una respuesta inmunitaria adquirida alterada.

En base a todo ello, se asocia la ELA a la llamada “*non-cell autonomous theory*”. Dicha teoría se sustenta en el hecho de que el proceso fisiopatológico de esta enfermedad se caracteriza por la convergencia de muchos tipos celulares, tanto células neuronales como no neuronales, que tienen como resultado final el

daño de las neuronas motoras (Boillée, Vande Velde, et al. 2006; Boillée, Yamanaka, et al. 2006; Ilieva et al. 2009). Evidencias experimentales demuestran que astrocitos de individuos con ELA, tanto casos de ELA familiar como de ELA esporádica, aislados de tejidos post-mortem, secretan mediadores que presentan efectos tóxicos sobre neuronas motoras *wild-type* (Haidet-Phillips et al. 2011). Los estudios de Boillée y colaboradores respaldan esta teoría (Boillée, Yamanaka, et al. 2006). Dichos estudios se realizaron mediante dos aproximaciones: en una de ellas restringieron la expresión de SOD1 mutada a nivel de las neuronas motoras, y en la otra aproximación a nivel de células microgliales y el linaje de macrófagos (Boillée, Yamanaka, et al. 2006). Se comprobó que animales en los que la expresión de la SOD1 mutada estaba adscrita a un tipo celular determinado no desarrollan un proceso patológico tan severo como el de los animales empleados como controles para la enfermedad, en los que la expresión de SOD1 mutada era ubicua.

5. Metabolómica en ELA

Se conoce como 'metaboloma' al conjunto dinámico de elementos químicos y pequeñas moléculas presentes en un organismo vivo, los llamados metabolitos, ya sean endógenos o incorporados desde el exterior. El metaboloma refleja el estado metabólico de un sistema vivo, siendo por tanto un potencial marcador de estados patológicos. Son varias las técnicas desarrolladas para analizar el metaboloma en los sistemas vivos; el método seleccionado depende fundamentalmente del tipo de muestra a analizar.

El primer estudio de metabolómica llevado a cabo en ELA se realizó *in vivo* mediante espectroscopía por resonancia magnética (MRS, del inglés *magnetic resonance spectroscopy*) con el fin de medir los metabolitos cerebrales de forma no invasiva (Jones et al. 1995; Gredal et al. 1997). Se observaron niveles

reducidos de *N*-acetil aspartato (NAA) en la corteza motora de pacientes con ELA, indicando pérdida neuronal en dicha región. Empleando la misma técnica se han llevado a cabo estudios a nivel del tallo cerebral (Cwik et al. 1998), tálamo, corteza cerebral posterior y cerebelo (Ikeda et al. 1998). Sin embargo, el único cambio significativo observado fue la reducción de NAA en la corteza motora, haciéndose dicho decremento más evidente a medida que avanza la enfermedad, y no observándose en otras regiones cerebrales. Estudios más recientes han extendido esta aproximación, el estudio de metabolitos *in vivo*, hacia la exploración del perfil metabólico de la región cervical de la médula espinal (Carew, Nair, Pineda-Alonso, et al. 2011; Ikeda et al. 2013). Se observó una reducción significativa de la relación NAA/Cr (Cr; creatina) y NAA/Myo (Myo; mio-inositol) en la región cervical de la médula espinal, asociada a la progresión de la enfermedad en pacientes con ELA (Ikeda et al. 2013). Cabe destacar que dichas variaciones se observaban también en individuos asintomáticos portadores de mutación en el gen SOD1, pero no así en los individuos sanos empleados en el estudio, sugiriendo este hecho que los cambios metabólicos observados tienen lugar en fases muy tempranas de la enfermedad (Carew, Nair, Andersen, et al. 2011). Sin embargo, las alteraciones metabólicas descritas no son específicas de la ELA, sino que también se observan en otros procesos patológicos donde la integridad neuronal se ve afectada, entre ellos: isquemia, trauma y tumores cerebrales (Ross & Bluml 2001). Esta baja especificidad se debe fundamentalmente al reducido número de metabolitos que pueden ser detectados y cuantificados *in vivo*. Por ello, para profundizar en el estudio del metaboloma en el contexto de la ELA sería interesante incluir también aproximaciones *in vitro* para estudiar el perfil metabólico de una forma más detallada, entre ellas: resonancia magnética nuclear (NMR) de alta resolución, resonancia magnética nuclear de alta

resolución por ángulo mágico (HR-MAS, del inglés *high-resolution magic angle spinning*) y espectroscopia de masas.

A principios del año 2005, Rozen y sus colaboradores publicaron un estudio metabolómico global realizado sobre plasma sanguíneo de pacientes con enfermedades de la neurona motora (MND, del inglés *motor neuron diseases*), un grupo heterogéneo de patologías entre las que se encuentra la ELA (Rozen et al. 2005). Estos autores analizaron aproximadamente 300 metabolitos. La tendencia general observada en los pacientes con MND era una reducción de los niveles metabólicos respecto a los controles. Además, estos autores identificaron una serie de metabolitos aparentemente característicos de procesos patológicos con afectación de motoneuronas inferiores. De los metabolitos analizados, observaron que 50 de ellos se encontraban elevados en pacientes con MND y más de 70 aparecían en niveles reducidos respecto a los individuos empleados como control en el estudio. De entre los componentes que aparecían incrementados, 12 fueron asociados a pacientes bajo tratamiento con riluzol. Si bien estos resultados preliminares son muy prometedores, requieren una validación adicional sobre un mayor número de pacientes con ELA (Rozen et al. 2005). Más recientemente, Lawton y colaboradores, llevaron a cabo un estudio similar sobre pacientes con ELA a los que clasificaron en cuatro grupos (posible ELA, probable ELA, probable ELA con soporte de laboratorio y ELA definitiva). Observaron que 32 metabolitos mostraban una variación significativa en el plasma de los pacientes del grupo con ELA, entre ellos, creatina, creatinina y glutamina, en comparación con el grupo de pacientes afectados con otros desórdenes de las motoneuronas (Lawton et al. 2014). Estos metabolitos se relacionan con procesos bioquímicos tales como: cambios neuronales, hipermetabolismo, daño oxidativo y disfunción mitocondrial, procesos aparentemente relacionados con el proceso

degenerativo asociado a la ELA. (Revisado en (Caballero-Hernandez et al. 2015)). Aunque precisa de una validación más extensa y exhaustiva, este estudio aporta datos interesantes que potencialmente permitirían discriminar, durante el diagnóstico, el ELA de otras patologías en las que también se afectan las motoneuronas (Lawton et al. 2014).

En el año 2008, Zoccolella y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que demostraron un incremento de homocisteína en plasma de pacientes con ELA respecto a poblaciones control (Zoccolella et al. 2008). Años más tarde, estos investigadores publicaron un estudio en el que demostraban que los pacientes con ELA de inicio bulbar y larga duración de la enfermedad, presentaban niveles reducidos de urato en suero; sin embargo, la malnutrición asociada a estos pacientes podría ser realmente la causa de esta observación (Zoccolella et al. 2011). Otro estudio publicado sobre la misma fecha, demostró que en plasma de pacientes con ELA los niveles de NAA estaban aumentados (Simone et al. 2011). Es importante mencionar que los autores de estos estudios matizan que se trata de resultados preliminares que deben ser confirmados en un estudio más amplio, ya que este incremento sólo se observó en algunos pacientes.

El estudio de los metabolitos en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con ELA también mostró resultados prometedores (Tarasiuk et al. 2012). Blasco y colaboradores, cuantificaron en LCR 17 metabolitos mediante NMR, y encontraron que el acetato se encontraba significativamente reducido en pacientes con ELA, mientras que piruvato y ácido ascórbico estaban aumentados (Blasco et al. 2010). Otros estudios sobre el análisis metabólico de muestras de LCR de pacientes con ELA, muestran evidencias de las diferencias existentes entre estos pacientes en función de la mutación de la

que sean portadores (Wuolikainen et al. 2011; Wuolikainen et al. 2012; Cistaro et al. 2014; Verschueren J De Coster L, Van Damme P and Van Laere K 2013).

Estudios sobre el perfil metabolómico de animales empleados como modelos en el estudio de la ELA, demuestran que se aprecian cambios a nivel de determinados metabolitos en las fases pre-sintomáticas del modelo. Existen evidencias de que los niveles corticales de glutamato, medidos mediante espectroscopía $^1\text{H-NMR}$ *in vivo*, se encuentran incrementados en los animales $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ antes del inicio de los síntomas (80 días de edad), en comparación con los animales control. Dicho incremento fue asimismo observado a los 115 días de edad, en la fase sintomática (Andreassen et al. 2001). En este estudio demuestran también que una dieta suplementada con creatina consigue ralentizar la progresión de la enfermedad y reducir los niveles de glutamato en fases pre-sintomáticas (75 días de edad); sin embargo, a los 115 días de edad no se aprecia dicha reducción asociada a la ingesta de creatina (Andreassen et al. 2001). Por otra parte, un estudio publicado posteriormente mostró que el tratamiento con creatina no mostraba efectos beneficiosos sobre la función muscular en el modelo transgénico de ELA ($\text{SOD1}^{\text{G93A}}$) (Derave et al. 2003). Años más tarde, Niessen y colaboradores llevaron a cabo un estudio sobre extractos de tejidos de animales $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ a diferentes edades; concretamente, analizaron: tallo cerebral, cerebelo, corteza cerebral y médula espinal, mediante $^1\text{H-NMR}$ de alta resolución (Niessen et al. 2007). Los resultados obtenidos mostraban que en fases pre-sintomáticas existían niveles reducidos de NAA, glutamina y ácido γ -aminobutírico (GABA). Se observó una reducción de los niveles de NAA en médula espinal a los 34 días de edad y en tallo cerebral a los 75 días de edad; en ambos casos las diferencias fueron observadas antes de que la pérdida de neuronas motoras fuese detectable de forma significativa (Niessen et al. 2007).

El efecto derivado de una dieta suplementada con creatina en el modelo animal SOD1^{G93A} fue también estudiado por Choi y colaboradores (Choi et al. 2009). La evolución de los animales fue analizada mediante espectroscopía por ¹H-NMR, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados del análisis *in vitro* mostraron que los niveles de glutamato en la corteza somatosensorial se encontraban incrementados a los 84 días de edad en comparación a los animales control, mientras que a 142 días, el metabolito que se observaba incrementado de una forma significativa era la glutamina (Choi et al. 2009). Las diferencias observadas en la médula oblonga, es decir, en el segmento más bajo de los tres que constituyen el tallo cerebral se hicieron patentes a los 114 días de edad, momento en el cual se detectaron niveles aumentados de glutamato, glutamina, glicina y taurina en comparación con los animales no transgénicos. Al analizar los resultados referentes a la médula oblonga de animales en una fase más avanzada de la enfermedad, 142 días, no se observa el mismo patrón. Existe incremento de las concentraciones de taurina y glutamina, y una reducción de la concentración de NAA en comparación con los animales no transgénicos (Choi et al. 2009). Curiosamente, las diferencias más evidentes fueron observadas en la región cervical y dorsal de la médula espinal a los 110 días de edad, se detectaron niveles reducidos de NAA y de *N*-acetil aspartato glutamato (NAAG), y niveles aumentados de glutamato, taurina e inositoles. Los autores de este estudio sugieren que las alteraciones metabólicas que tiene lugar durante la ELA, a los 110 días de edad, tienen lugar de acuerdo al siguiente orden: médula espinal > bulbo raquídeo > corteza cerebral. Por otra parte, la aproximación *in vivo* llevada a cabo por estos investigadores se realizó en base a los síntomas observados en el animal, dividiendo de este modo a los animales en tres grupos: 1) no afectados, 2) animales con parálisis en extremidades posteriores y 3) animales con parálisis en extremidades posteriores y parálisis parcial en las anteriores. El resultado del análisis mostró

que los animales con las cuatro extremidades afectadas (grupo 3), mostraban niveles de NAA significativamente reducidos en comparación con el grupo de animales no afectados (grupo 1). Cuando se llevó a cabo el mismo análisis, pero mediante aproximación *in vitro*, se comprobó que en la corteza motora de los animales del grupo 3 se detectaban niveles reducidos de la relación NAA/creatina. Además, estos autores demostraron que la dieta suplementada al 2% con creatina ralentizó la pérdida de peso de los animales y tuvo un efecto positivo sobre la pérdida de NAA, aunque la supervivencia de los animales no fue evaluada. Otra de las aportaciones de este estudio fue que no se detectaron cambios a nivel de metabolitos del cerebelo en animales SOD1^{G93A} en comparación con los controles, ni los niveles de creatina variaron entre los diferentes grupos estudiados. Estos hallazgos son de gran interés ya que muestran que pueden ser potencialmente utilizados como controles en los estudios metabolómicos: el cerebelo, como control de los niveles metabólicos del animal; y los niveles de creatina, para normalizar los valores obtenidos de otros metabolitos (Choi et al. 2009).

A pesar de los estudios metabolómicos llevados a cabo, tanto en pacientes con ELA como en animales modelos para esta enfermedad, los resultados obtenidos hasta el momento no son suficientes como para definir el perfil metabolómico asociado a esta patología. Cabe destacar la importancia de estandarizar los protocolos que garanticen la reproducibilidad de los resultados obtenidos en los estudios metabolómicos, ya que se sabe que la manipulación de las muestras tiene un efecto crucial en el perfil metabolómico obtenido (Wuolikainen et al. 2009).

6. VIP/NAP en ELA

El potencial terapéutico del octapéptido NAP ha sido explorado en el contexto de la ELA. En este sentido, Jouroukhin y colaboradores llevaron a cabo dos estudios. En el primero de ellos demostraron que la administración profiláctica de NAP en su forma D-aminoácidos incrementaba la supervivencia de los animales SOD1^{G93A} (comenzando las inyecciones el día 2 postnatal) (Jouroukhin et al. 2012). En el segundo estudio, demostraron que al tratar animales SOD1^{G93A} de 11 semanas de edad con altas dosis de NAP, se retrasaba el inicio de los síntomas y se ralentizaba la velocidad de progresión de la enfermedad en el modelo. Dado que aún no existen biomarcadores que permitan un diagnóstico temprano de esta patología, esta última aproximación parece ser la más interesante desde el punto de vista terapéutico (Jouroukhin et al. 2013). En todo caso, ambos trabajos muestran resultados prometedores del uso de NAP o derivados en el contexto de la ELA.

El potencial terapéutico del neuropéptido VIP no ha sido tan extensamente explorado en el contexto de esta enfermedad neurodegenerativa, a pesar de su importante papel regulador en el sistema nervioso e inmunitario. VIP es capaz de inducir la secreción de ADNP por parte de astrocitos y macrófagos (Illana Gozes et al. 2003; Quintana et al. 2006) y de inhibir la activación de líneas monocíticas/macrofágicas, entre ellas, la microglía (Delgado et al. 2008). La limitada biodisponibilidad y estabilidad fisiológica de VIP podría ser uno de los motivos por los que dicho péptido no ha sido tan ampliamente estudiado en este sentido. Por ello, se han orientado muchos trabajos hacia el estudio del potencial terapéutico asociado a la modulación de receptores de VIP (Goursaud et al. 2011), así como hacia la exploración del efecto de derivados de este neuropéptido (Goursaud et al. 2015).

Las propiedades neuroprotectoras e inmunomoduladoras de PACAP, hacen que haya sido explorado en el contexto de la ELA, debido al importante papel que la neuroinflamación juega en esta patología. Se han llevado a cabo estudios en dos sentidos, tanto para investigar el papel de PACAP endógeno como para examinar su efecto como potencial agente terapéutico. Se sabe que PACAP es inducido por neuronas motoras en modelos de lesión neural (Armstrong et al. 2003; Chen & Tzeng 2005) y que tiene capacidad neuroprotectora sobre cultivos neuronales de rata frente a la excitotoxicidad dependiente de glutamato (Tomimatsu & Arakawa 2008). Todo ello, llevó a Ringer y colaboradores a evaluar el papel de PACAP endógeno en un modelo animal de ELA (Ringer et al. 2013). Para ello emplearon ratones del modelo SOD1^{G93A}, y los cruzaron con una cepa de ratones carentes de PACAP (PACAP -/-). Los resultados obtenidos mostraban que la ausencia de PACAP incrementa la supervivencia de los animales portadores del transgen. Se observó también que en estos animales, carentes de PACAP y portadores del transgen, el fenotipo de la microglía se veía alterado respecto a los ratones SOD1^{G93A} que sí expresaban PACAP. En el caso de los ratones SOD1^{G93A}, se observa un incremento importante en la expresión del marcador de activación Iba1 (del inglés *ionized calcium-binding adapter molecule 1*) por parte de la microglía, no observándose este incremento en el caso de los animales SOD1^{G93A} PACAP -/-. Todo ello indica que PACAP promueve un estado fagocítico clásico con un perfil proinflamatorio M1 en la microglía; este hecho se observa en los animales SOD1^{G93A} y no así en los SOD1^{G93A} PACAP -/- (Ringer et al. 2013).

7. Modelos animales en el estudio de la ELA

Son varios los modelos animales disponibles para el estudio de la ELA, la mayoría de ellos desarrollados en ratones y ratas, pero es importante destacar que existen también modelos desarrollados sobre el pez cebra, la mosca

Drosophila y el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). El avance en los conocimientos sobre las bases genéticas de multitud de casos de ELA familiar ha posibilitado el desarrollo de diferentes modelos animales para el estudio de dicha patología. Los modelos animales son claves en el estudio de los mecanismos responsables del proceso degenerativo asociado a la ELA, así como en el ensayo de potenciales agentes terapéuticos. Sin embargo, las características neuropatológicas observadas en los modelos animales no son completamente equivalentes a las observadas en pacientes con ELA (Kato 2008). A continuación se hace una breve descripción de los modelos animales utilizados en el estudio de la ELA:

7.1. Modelo SOD1

El primer modelo animal para el estudio de ELA fue desarrollado en ratones, poco tiempo después de la identificación de casos familiares de ELA debidos a mutaciones en el gen de SOD1 (Rosen et al. 1993). Este modelo fue desarrollado por Gurney y colaboradores en el año 1994, y consiste en un ratón transgénico portador del gen humano SOD1 mutado en el codón correspondiente a la posición del aminoácido 93, resultando en la sustitución de la glicina por alanina; se conoce como modelo SOD1^{G93A} (Gurney et al. 1994). Es importante mencionar que en este modelo, la SOD1 mutada no se expresa exclusivamente en neuronas, sino en todos los tipos celulares. En este modelo animal, que es el más extendido en el estudio de la ELA, los ratones desarrollan una sintomatología similar a la observada en pacientes (debilidad en las extremidades inferiores, pérdida de masa muscular, degeneración de neuronas motoras y muerte) (Turner & Talbot 2008; Lee et al. 1996) (Figura 4). Se trata de un modelo que requiere un alto número de copias del transgen, ya que la

reducción en el número de copias del transgen se correlaciona de forma clara con la supervivencia del animal SOD1^{G93A} (Alexander et al. 2004).

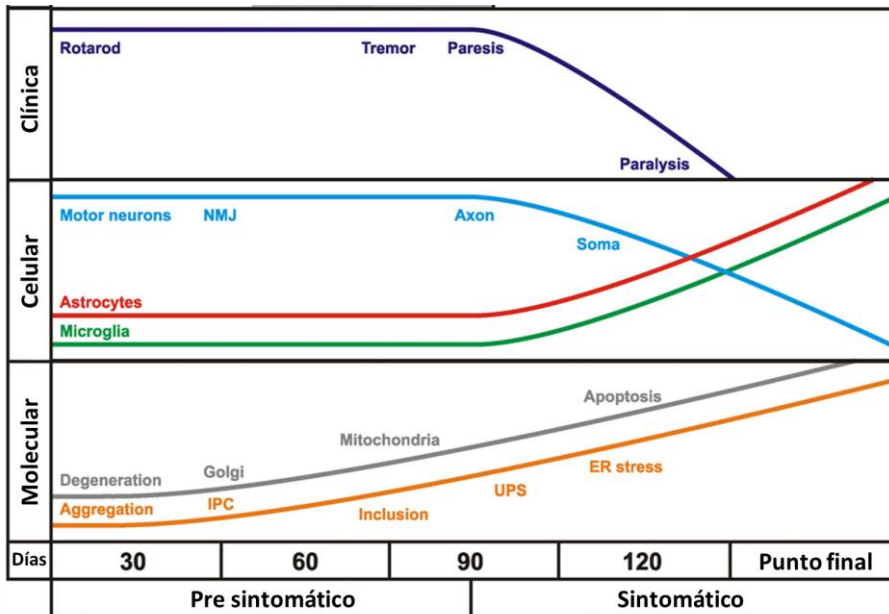


Figura 6. Aspectos clínicos y neuropatológicos descritos en el modelo SOD1^{G93A}. Los animales desarrollan temblor de las extremidades inferiores, debilidad y déficits locomotores a los 3 meses de edad aproximadamente, con degeneración axonal asociada. Todo ello progresa hacia una severa parálisis acompañada de pérdida de motoneuronas en la médula espinal y de gliosis reactiva. La presencia de agregados de la proteína SOD1 mutada acaba formando los llamados 'cuerpos de inclusión' insolubles, que disparan la respuesta mediada por el proteasoma-ubiquitina y con ello la degeneración subcelular en las motoneuronas. (Adaptación de (Turner & Talbot 2008))

En el modelo SOD1^{G93A} se inicia la sintomatología de la enfermedad con temblor en una o varias extremidades a los 70-90 días de edad aproximadamente (Figura 5), el avance del proceso patológico lleva consigo paresia de las extremidades posteriores que se extiende hacia las anteriores,

todo ello culmina en una severa cuadriplejía y muerte del animal a los 120-150 días de edad aproximadamente (Kato 2008).



Figura 7. Fenotipo de los ratones B6SJL- $SOD1^{G93A}$. Los animales que portan el transgen $SOD1^{G93A}$ comienzan a presentar, alrededor de las 12 semanas de edad (84 días aproximadamente), síntomas que se asemejan a los observados en pacientes con ELA. Estos síntomas generalmente comienzan con la presencia de temblores en las extremidades posteriores y progresan con paresia de las mismas, provocando un caminar anormal por parte de los animales, acompañado de pérdida de peso. Esta paresia evoluciona hacia una posterior parálisis que dificulta en gran medida el movimiento del animal.

En función de la mutación portada por el gen humano $SOD1$ y del número de copias del transgen en el animal, existen diferentes modelos de $SOD1$, entre ellos: $SOD1^{G37R}$ (Wong et al. 1995) y $SOD1^{G85R}$ (Bruijn et al. 1997). Tanto en el modelo $SOD1^{G93A}$ como en el modelo $SOD1^{G37R}$ se ha demostrado que la progresión de la enfermedad en el animal se debe a una ‘ganancia de función’ de la $SOD1$ y no a la pérdida de dicha actividad enzimática (Borchelt et al. 1994; Turner & Talbot 2008). En el modelo animal transgénico $SOD1^{G37R}$ el inicio de los síntomas es posterior al observado en el modelo $SOD1^{G93A}$ (Turner & Talbot 2008). Una característica fundamental de este modelo es la degeneración de mitocondrias en la médula espinal del animal, acompañada de la alteración de

otros procesos que en conjunto conllevan al desarrollo del proceso patológico en el animal (Turner & Talbot 2008). En el modelo SOD1^{G93A} es característica la acumulación de radicales libres en la médula espinal, pero no así en los animales SOD1^{G37R} (Turner & Talbot 2008). Los animales del modelo SOD1^{G85R} se caracterizan por un inicio tardío de los síntomas, a los 8-14 meses de edad, y por una progresión muy agresiva de la enfermedad, ya que el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y el punto final artificial es inferior a un mes (Turner & Talbot 2008). Estudios llevados a cabo apuntan a que la enzima SOD1 mutada tiene propiedades tóxicas (Turner & Talbot 2008). Se ha demostrado que tanto los animales carentes del gen SOD1 (*knockout* para SOD1), como los animales que sobreexpresan la SOD1 humana normal, no presentan degeneración de neuronas motoras y no desarrollan la enfermedad (Turner & Talbot 2008; Ho et al. 1998; Reaume et al. 1996; Rothstein 2009). Cabe mencionar que se han desarrollado también modelos basados en mutaciones en el gen SOD1 en otras especies animales, entre ellas: rata, pez cebra, *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*.

Es importante mencionar que en el modelo SOD1 la pérdida de neuronas motoras va acompañada de astrocitosis, presencia de inclusiones de SOD1 positivas y formación de vacuolas. Estas alteraciones se observan fundamentalmente en neuronas motoras inferiores (Kato 2008).

Algunas de los posibles mecanismos de toxicidad para las neuronas motoras asociados a la patogenia de la ELA, se basan en hallazgos obtenidos a partir del modelo SOD1. El daño oxidativo, la acumulación de agregados intracelulares, la disfunción mitocondrial, los defectos en el transporte axonal, la excitotoxicidad por glutamato y la implicación de las células gliales, son ejemplos de ello. Probablemente, el inicio y progresión de la enfermedad se deban a la convergencia de todas estas vías (Rothstein 2009).

Además de sus contribuciones a la comprensión de los mecanismos patogénicos que subyacen en la ELA, el modelo animal de SOD1 ha permitido llevar a cabo ensayos terapéuticos. Son muchos los tratamientos estudiados, dirigidos contra los mecanismos tóxicos postulados, entre ellos: drogas antioxidantes, antiinflamatorias, factores anti-agregación y drogas que actúan frente a excitotoxinas. Sin embargo, algunos tratamientos que resultaron ser prometedores al ensayarlos sobre el modelo de SOD1, no tuvieron el mismo efecto beneficioso al ser trasladados a pacientes con ELA (Turner & Talbot 2008). El hidroclicorato de minociclina, también conocido como minociclina, es un buen ejemplo de ello. Este antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclinas, demostró tener efecto neuroprotector, al parecer por su acción antiapoptótica y antiinflamatoria, sobre modelos de isquemia cerebral, traumatismo y enfermedades neurodegenerativas (Gordon et al. 2007). La minociclina demostró aumentar un 10-22% la supervivencia de ratones del modelo SOD1. Sin embargo, el ensayo en fase III realizado sobre 412 pacientes con ELA no resultó tener el mismo resultado positivo, e incluso la enfermedad progresó de forma más agresiva en los pacientes tratados con minociclina que en los pacientes del grupo placebo. Este ensayo fue llevado a cabo en 31 centros de Estados Unidos, y el reclutamiento de los pacientes tuvo lugar entre Noviembre de 2003 y Diciembre de 2005 (Gordon et al. 2007).

7.2. Modelo TDP-43

En el estudio de la ELA también se emplean modelos originados mediante mutaciones en el gen TARDBP, que codifica la proteína TDP-43, en base a los hallazgos de casos de ELA familiar asociados a mutaciones en dicho gen (Gitcho et al. 2008; Kabashi et al. 2008; Sreedharan et al. 2008; Van Deerlin et al. 2008).

Se han desarrollado modelos de TDP-43 en ratones, ratas, pez cebra y mosca de la fruta (Joyce et al. 2011).

Es importante mencionar que el desarrollo de un modelo animal transgénico que sobreexpresa TDP-43 mutada no ha sido fácil, ya que muchos de los roedores morían poco después de nacer debido a un fallo intestinal, poniendo este hecho de manifiesto la elevada toxicidad de la TDP-43 mutante (Hatzipetros et al. 2014). En este sentido, se han creado modelos roedores basados en diferentes mutaciones del gen de TDP-43 humano y en diferentes niveles de expresión de la proteína mutada. La evolución de la enfermedad en este modelo depende tanto de los niveles de expresión de TDP-43 como del momento en el que dicha expresión se iniciaba (prenatal o posnatal), condicionando todo ello el momento de inicio de la enfermedad y la severidad de la misma. Los modelos desarrollados en este sentido muestran que la degeneración neuronal asociada a la expresión de TDP-43 mutada tiene lugar de forma dosis-dependiente, existiendo un nivel a partir del cual la sobreexpresión de TDP-43 es tóxica (Wegorzewska & Baloh 2011). En el caso de los ratones transgénicos para TDP-43 se ha observado que la disfunción motora va acompañada de una pérdida progresiva del movimiento normal de las extremidades inferiores, así como de una pérdida notable del peso corporal del animal y la subsiguiente parálisis asociada (Wegorzewska & Baloh 2011; McGoldrick et al. 2013). En este modelo se observa una afectación predominante de las neuronas motoras superiores, a diferencia de lo que ocurre en el modelo SOD1, donde se observa mayor afectación de las motoneuronas inferiores. Sin embargo, en el modelo de TDP-43 la neurodegeneración es más amplia, viéndose también afectadas otras regiones corticales, el hipocampo y el cerebelo (Wegorzewska & Baloh 2011; Zhou et al. 2010).

No se conoce al completo el mecanismo por el cual TDP-43 está implicado en el proceso neurodegenerativo. Algunos autores defienden que la presencia de inclusiones citoplasmáticas con agregados de TDP-43 tiene un papel tóxico. Otros autores apoyan la idea de que la pérdida o alteración de la función de TDP-43 en el núcleo es responsable de este efecto (Wegorzewska & Baloh 2011). Lo que sí se sabe es que la neurodegeneración asociada al modelo va acompañada de activación glial, tanto de astrocitos como de células microgliales circundantes a las motoneuronas (Wegorzewska & Baloh 2011).

En relación al modelo animal de TDP-43, es importante mencionar, que en el año 2014, Hatzipetros y colaboradores publicaron un estudio en el que basándose en las evidencias experimentales publicadas con anterioridad sobre la muerte de muchos de los roedores después de nacer debido a un fallo intestinal, decidieron explorar con más detalle el fenotipo asociado a los animales portadores del transgen TDP-43 humano que lleva asociada la mutación A315T. Sus resultados muestran que la sobreexpresión del transgen humano TDP-43 mutado en los plexos mesentéricos del colon provoca una neurodegeneración progresiva en dicha región (Hatzipetros et al. 2014). Este hecho se relacionaría con el fallo de la motilidad gastrointestinal asociado al modelo. El fenotipo observado es dependiente tanto de la cepa como de la edad del animal; los machos C57BL/6J son los que exhiben la forma más agresiva del proceso patológico asociado (Hatzipetros et al. 2014). Estos autores también demuestran que en la médula espinal de los animales de este modelo, el modelo de TDP43A315T, se detectan agregados de proteínas ubiquitinadas, pero no se detectan agregados de TDP-43 en el citoplasma de las motoneuronas (Hatzipetros et al. 2014). Por último, concluyen que estos animales no exhiben déficits neuromusculares similares a los observados en la ELA. Se trataría de un modelo útil para el estudio del proceso

neurodegenerativo asociado al fallo gastrointestinal; sin embargo, no constituiría un modelo adecuado para el estudio de terapias en ELA (Hatzipetros et al. 2014).

7.3. Modelo FUS

Estudios recientes han demostrado que las mutaciones en el gen FUS inducen, en proporción similar a la observada en el caso de mutaciones en TDP-43, casos de ELA familiar (Kabashi et al. 2011). Existen también modelos animales generados para el estudio de la ELA basados en estos hallazgos (McGoldrick et al. 2013). El modelo transgénico de FUS en ratas consiste en la sobreexpresión de FUS humana mutada (R521C), en el que la posición 521 se sustituye la arginina por cisteína. Esta mutación conduce a una pérdida progresiva de la función motora, acompañada de déficits de aprendizaje y memoria en las fases finales de la enfermedad (McGoldrick et al. 2013). Los estudios llevados a cabo sobre este modelo demuestran que presenta características fisiopatológicas similares a la ELA y a la DFT (Huang et al. 2011).

Existen evidencias que manifiestan que los ratones que no expresan la proteína FUS (*knockout* para FUS) mueren inmediatamente después de nacer (Van Den Bosch 2011). Si bien la sobreexpresión de FUS humana carente de mutación no tiene como consecuencia el desarrollo de un estado patológico con afectación de motoneuronas, sí lleva consigo pérdida de neuronas de la corteza frontal e hipocampal en edad avanzada junto con déficit de aprendizaje y memoria (Huang et al. 2011).

7.4. Otros modelos

Otro de los modelos animales empleados en el estudio de enfermedades de la neurona motora como es el caso de la ELA, es el llamado modelo animal *wobbler*. Se trata de un modelo murino que surgió a partir de una mutación espontánea en el gen autosómico recesivo VPS54 (del inglés *vacuolar protein sorting 54*). La proteína VPS54 forma parte del complejo proteico asociado al aparato de Golgi, el complejo GARP (del inglés *Golgi Associated Retrograde Protein Complex*) (González Deniselle et al. 2001; Boillée et al. 2003; Schmitt-John 2015). El animal muestra degeneración de las motoneuronas de la médula espinal y tallo cerebral, con progresión hacia el músculo esquelético. A partir de la cuarta semana de edad, el animal presenta un caminar anómalo que va avanzando hacia un estado de debilidad y atrofia con afectación predominante de los músculos de la cabeza, cuello y extremidades anteriores (Duchen & Strich 1968). Sin embargo, la enfermedad desarrollada por este modelo no es la típica enfermedad de la motoneurona, siendo la degeneración asociada mucho más extensa (Van Den Bosch 2011).

El reciente hallazgo de la expansión de seis nucleótidos de secuencia "GGGGCC" (G₄C₂) en el gen *C9ORF72*, asociada tanto a casos de ELA como de DFT (Renton et al. 2011; Mariely DeJesus-Hernandez et al. 2011) ha dado pie al desarrollo de un nuevo modelo animal que mimetiza los fenotipos clínicos y neuropatológicos de ambas patologías asociados a esta mutación (c9FTD/ALS; del inglés *frontotemporal dementia/amyotrophic lateral sclerosis*) (Chew et al. 2015; Hukema et al. 2014). Una de las características neuropatológicas del modelo desarrollado por Chew y colaboradores, es la presencia de inclusiones de la proteína TDP-43 en su forma fosforilada. Estos hallazgos podrían sugerir que el alto número de repeticiones G₄C₂ asociadas al gen *C9ORF72* en el

modelo c9FTD/ALS, podría ser uno de los factores que iniciarían los efectos tóxicos asociados a TDP-43 (Chew et al. 2015).

La principal limitación de los modelos animales disponibles para el estudio de la ELA es que éstos solo representan una pequeña proporción de los casos de esta enfermedad en humanos. Estos modelos se basan en modificaciones genéticas, no englobando por tanto los casos esporádicos de esta enfermedad, que como se mencionó anteriormente, representar el grosor de los casos de ELA. Sería por ello fundamental el desarrollo de un modelo animal que englobase los casos de ELA esporádica.

Por otra parte, es importante destacar que los modelos animales no reproducen con exactitud la neuropatología asociada a pacientes, y la degeneración intrínseca a los mismos no es exclusiva de motoneuronas. El modelo de ratón $SOD1^{G93A}$, a pesar de ser el más utilizado en investigaciones preclínicas, representa una pequeña fracción de los casos de ELA y debido a tratarse de un modelo de alto número de copias del transgen en el animal, la progresión de los síntomas es tan agresiva que limita las intervenciones terapéuticas que puedan llevarse a cabo en el mismo, así como la extrapolación de los resultados a humanos. Los modelos de ratón TDP-43 son también muy agresivos, siendo este hecho un problema a la hora de llevar a cabo estudios sobre el potencial terapéutico de determinadas drogas.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo fueron:

1. Efecto de los neuropéptidos VIP y NAP en el modelo SOD1^{G93A}
 - 1.1. Evaluar el efecto de la administración exógena de VIP y NAP en el modelo murino SOD1^{G93A}, tanto desde un punto de vista profiláctico, comenzando en fase pre-sintomática, como terapéutico, comenzando tras el inicio de los primeros síntomas en el modelo.
 - 1.2. Explorar el efecto la administración a animales SOD1^{G93A} en fase sintomática de células mesenquimales de médula ósea de ratón transducidas con el gen de VIP mediante lentivirus.
 - 1.3. Estudiar el papel fisiológico de VIP endógeno en el contexto de la ELA, empleando animales SOD1^{G93A} carentes de VIP.
2. Respuesta inmunitaria periférica en ELA
 - 2.1. Explorar la respuesta derivada del estímulo de TLRs en las células inmunitarias periféricas en el contexto de la ELA tanto en pacientes con ELA como en el modelo SOD1^{G93A}, evaluando de este modo si existía un perfil hipo respondedor o híper respondedor asociado a esta enfermedad.
 - 2.2. Estudio de posibles mecanismos de acción que involucren a los TLRs
3. Estudio metabólico sobre el modelo SOD1^{G93A}
 - 3.1. Estudio del perfil metabólico por RMN de diferentes regiones anatómicas de relevancia en el modelo SOD1^{G93A} con el fin de explorar potenciales marcadores de diagnóstico y pronóstico en la ELA.

**Capítulo 1. EFECTO DE LOS
NEUROPEPTIDOS VIP Y NAP
EN EL MODELO SOD1^{G93A}**

I. RESUMEN Y FUNDAMENTO TEÓRICO

La gran capacidad inmunomoduladora asociada a VIP hace que se le otorgue un papel relevante como potencial agente terapéutico en ciertas enfermedades neurodegenerativas que llevan consigo asociada una importante inflamación crónica. Estudios publicados sugieren que alteraciones en cuanto a los niveles de expresión de receptores de neuropéptidos vasoactivos tales como VIP y PACAP podrían estar involucradas en el desarrollo de la ELA y de otras enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (Revisado en (Staines 2008)). Entre las funciones biológicas asociadas a VIP y PACAP incluimos: i) efectos antioxidantes y antiapoptóticos en un modelo para el estudio de la enfermedad de Parkinson (EP) (Tunçel et al. 2012), ii) propiedades antiinflamatorias, iii) regulación de la gliosis reactiva, y iv) efectos protectores sobre la función motora en el contexto de enfermedades neurodegenerativas y en modelos de daño neuronal agudo (Korkmaz et al. 2010; Waschek 2013). Por todo ello cabría esperar que VIP y PACAP constituyeran herramientas de gran interés en el tratamiento de la ELA. Por otra parte, el hecho de que la expresión de VIP se encontrase alterada en líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA y en modelos animales para el estudio de la ELA (Goursaud et al. 2011; Werdelin et al. 1989), da pie a estudiar el potencial beneficio que dicho neuropéptido puede presentar en el modelo de ratón SOD1^{G93A}.

Esta hipótesis ha sido apoyada por evidencias experimentales del papel de VIP en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), observándose interesantes y complejos efectos de este neuropéptido sobre la historia natural de la enfermedad (Gonzalez-Rey et al. 2006; Fernandez-Martin et al. 2006; Tan et al. 2014; Abad et al. 2010). En este contexto cabe mencionar el reciente hallazgo llevado a cabo por Tan y sus colaboradores (Tan et al. 2014). Estos autores han demostrado que ratones deficientes del receptor

VPAC2 desarrollaban una EAE exacerbada, todo ello le otorga a VIP, y a sus mediadores, un potencial e importante papel en la prevención de EAE en el modelo experimental murino para el estudio de la esclerosis múltiple (Tan et al. 2014).

En este sentido existen también estudios que exploran el papel de PACAP, de VIP, de derivados de VIP y de receptores de dichos neuropéptidos en el contexto de la ELA (Goursaud et al. 2011; Goursaud et al. 2015; Ringer et al. 2013), demostrando también el complejo papel que este neuropéptido tiene en la evolución de la enfermedad. En nuestro estudio hemos evaluado el efecto de la administración exógena de VIP, tanto desde un punto de vista profiláctico, comenzando en fase pre-sintomática, como terapéutico, comenzando tras el inicio de los primeros síntomas en el modelo. En este sentido, fue también explorado el efecto de una única administración en fase sintomática, de células mesenquimales transducidas con el gen de VIP mediante lentivirus. Por otra parte y con el fin de explorar el papel de VIP endógeno en el contexto de la ELA, se cruzaron animales *knock out* para VIP con animales SOD1^{G93A}, obteniendo así animales transgénicos carentes de VIP a los que se les realizó un seguimiento de la progresión de la enfermedad.

Al neuropéptido VIP se le han atribuido asociado también efectos neuroendocrinos (Vu et al. 2015) y existen estudios que demuestran efectos de VIP dependientes del sexo (Lacombe et al. 2007; Piroli et al. 2004; Lim et al. 2008; Gozes et al. 1993; Asnicar et al. 2002). Por este motivo nos planteamos explorar si el sexo del animal juega un papel en la progresión de la enfermedad en animales SOD1^{G93A} carentes de VIP.

El efecto terapéutico de la molécula bioactiva NAP, perteneciente a la proteína ADNP, fue también evaluado en el contexto de la ELA. Al igual que en el caso de

VIP, se llevó a cabo tanto una aproximación profiláctica como terapéutica. NAP es considerado un potente neuroprotector capaz, entre otras cosas, de evitar la muerte neuronal asociada al bloqueo eléctrico por tetrodotoxina y a la excitotoxicidad por NMDA (Bassan et al. 1999).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales experimentales

Consideraciones éticas

La colonia de animales fue establecida en un animalario tipo SPF (*Specific Pathogen Free*), se les proporcionó en todo momento agua y comida *ad libitum*. Los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por el comité ético de experimentación animal en CABIMER (CEEA-CABIMER) con código CEEA 25-2010.

1.1. Colonia de animales SOD1^{G93A}

1.1.1. Animales experimentales

Actualmente el modelo preclínico más empleado en el estudio de la ELA es el modelo de los ratones transgénicos SOD1^{G93A}, los cuales portan el gen humano SOD1 en múltiples copias con una sustitución Ala-Gly en el codón 93. Estos animales desarrollan una sintomatología que semeja el curso de ELA en seres humanos. Los animales usados fueron ratones machos B6SJL-Tg(SOD1^{G93A})1Gur/J (número de referencia 002726) y hembras híbridas B6SLJ F1 (número de referencia SN100012). Todos ellos procedentes del proveedor estadounidense *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA).

1.1.2. Establecimiento y mantenimiento de la colonia ALS

El primer paso para la puesta en marcha de los experimentos fue el establecimiento de la colonia de ratones y el aprendizaje sobre el manejo de los mismos. La colonia se inició y se mantiene mediante cruces polígamos consistentes en un ratón macho hemicigoto transgénico B6SJL-Tg(SOD1^{G93A})1Gur/J con hembras híbridas B6SLJ F1, producto del cruce

endogámico entre una hembra C57BL/6J (B6) y un macho SJL/J (SJL). En cada una de las generaciones las hembras fueron agrupadas y clasificadas aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales, mientras que los ratones machos se conservaron para el mantenimiento de la colonia. Se utilizaron aquellas camadas con nacimientos espaciados en un máximo de 6 días, con el objetivo de garantizar homogeneidad en cuanto a las edades de los ratones experimentales. En los estudios realizados se incluyó un grupo de ratones no portadores del transgen como controles de ganancia de peso y habilidad motora en el rota-rod.

1.1.3. Genotipado de ratones

Uno de los puntos fundamentales es el genotipado de los ratones de la colonia, con el fin de identificar a los ratones transgénicos. El genotipado se lleva a cabo por PCR a partir del ADN genómico extraído de la cola de los ratones mediante el método de fenol-cloroformo, con el fin de determinar la presencia del transgen. Los oligonucleótidos específicos empleados para la amplificación del transgen SOD1^{G93A} son los siguientes: sentido 5' -CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA - 3' y antisentido 5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA - 3'. Como control interno de amplificación usamos el gen IL-2 de ratón, siendo los oligonucleótidos específicos: sentido 5' - CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT - 3', antisentido 5' - GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C -3'. La enzima usada en la amplificación es la *Mytaq polymerase* (Bioline, Londres, Reino Unido). Las condiciones de amplificación empleadas fueron las sugeridas para esta cepa de ratones en *Jackson Laboratory* con ligeras modificaciones. Las condiciones de PCR fueron: 3 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; y 35 ciclos de 15 segundos desnaturalización a 95°C, 15 segundos de alineamiento a 55°C y 10 segundos de extensión a 72°C. Los oligos para el transgen SOD1^{G93A} y para el control interno IL-2 se usaron a una concentración final de 0.4 µM.

1.1.4. Monitorización del número de copias del transgen

Es importante destacar la importancia de cuantificar el número de copias del transgen ya que está estrechamente vinculado con la velocidad de progresión de la enfermedad. La experiencia adquirida en el manejo del modelo hizo que decidiésemos monitorizar el número de copias del transgen en cada ratón, con el fin de hacer más precisa la interpretación de los resultados. Este hecho no es siempre tenido en cuenta en los estudios realizados en este modelo animal y puede introducir errores en los resultados obtenidos.

Para garantizar un adecuado número de copias del transgen en los ratones empleados en los grupos experimentales y en los utilizados para el mantenimiento de la colonia, se lleva a cabo el análisis mediante PCR cuantitativa (qPCR). Los oligonucleótidos usados son los mismos que los empleados en la PCR los oligos para SOD1^{G93A} se emplean a una concentración final de 0.4 μ M, y los oligos para IL-2 a 0.5 μ M. Para la qPCR se empleó SYBR[®] *Green PCR Master Mix* (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las condiciones de qPCR fueron: 3 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; y 40 ciclos de 15 segundos desnaturalización a 95°C, 35 segundos de alineamiento a 60°C y 33 segundos de extensión a 72°C.

1.1.5. Evaluación de la progresión de la enfermedad

La evaluación de la progresión de la enfermedad en el animal se realiza mediante el registro periódico el peso de los animales, la valoración de la parálisis de las extremidades inferiores en base a una escala neurológica previamente definida, y el estudio de la coordinación motora y del equilibrio empleando la conocida prueba comportamental del rota-rod, un cilindro rotatorio sobre el cual se hace andar al ratón.

El peso se monitoriza semanalmente hasta que los ratones llegan al 90% del peso máximo alcanzado, considerando como peso máximo aquel a partir del cual el animal sufre dos pérdidas consecutivas de peso. Una vez los animales alcanzan dicho 90%, la toma de pesos se hace diariamente o cada dos días en función del estado del ratón.

La evaluación de la escala neurológica se realiza sosteniendo al ratón por la cola y suspendiéndolo en el aire. Se califica la extensión de las extremidades de la siguiente manera: ver tabla 3.

Tabla 3. Escala neurológica en el modelo SOD1^{G93A}

criterio	Calificación	Descripción
Temblores en las extremidades inferiores, pero extensión normal	5	Al sostener al animal por la cola y suspenderlo en el aire se observa temblor en las extremidades inferiores pero las extiende de forma uniforme y completa
Extensión anormal las extremidades inferiores	4	Al sostener al animal por la cola y suspenderlo en el aire no es capaz de extender ambas extremidades de forma completa y uniforme.
Forma anormal de la andada	3	Cuando el ratón camina no lo hace de forma uniforme, se observa que mueve con dificultad las extremidades inferiores.
Paresia en las extremidades inferiores	2	El ratón presenta parálisis parcial de una o de ambas extremidades inferiores
Parálisis en las extremidades inferiores	1	El ratón no es capaz de mover una o ambas extremidades inferiores.

La evaluación del equilibrio y coordinación motora de los ratones se lleva a cabo en un rota-rod (Ugo Basile, Varese, Italia). La prueba se realiza semanalmente a partir de las 8 semanas de edad, registrándose el tiempo máximo que el animal es capaz de mantenerse andando sobre el cilindro. Cada sesión consiste en 3 pruebas, cada una de ellas con una duración máxima de 5

minutos, entre cada una de las pruebas los animales deben descansar 15 minutos. La velocidad de inicio es de 4 rpm y se incrementa cada minuto hasta un máximo de 16 rpm. Los animales reciben entrenamiento previo en el rotarod, para aprender a andar sobre el cilindro en movimiento. Si el ratón se caía en menos de 10 segundos desde el comienzo de la sesión, se le daba otra oportunidad.

1.1.6. Determinación del inicio de la enfermedad

Para determinar el inicio de la enfermedad nos basamos en el punto en el que el animal alcanza su peso máximo, considerando como peso máximo aquel a partir del cual el animal sufre dos pérdidas consecutivas de peso. Dicho inicio de la enfermedad tiene lugar aproximadamente a las 12 semanas de edad (Figura 8).

1.1.7. Determinación de la fase terminal (punto final artificial)

Para determinar la fase terminal de la enfermedad en los ratones, se emplean tres criterios. El primero consiste en la incapacidad del animal para enderezarse en 30 segundos después de ser colocado sobre un costado; el segundo criterio se trata de la pérdida de un 20% del peso máximo alcanzado por dicho animal, y el tercero, la aparición de infecciones severas en el ojo, fruto de la posición de costado mantenida por el animal. El cumplimiento de uno o más de estos tres criterios implica el sacrificio ético del animal. La supervivencia descrita por *The Jackson Laboratory* para el modelo es de 128.9 ± 9.1 días (Leitner et al. 2009) (Figura 8).

1.1.8. Determinación del tiempo de duración de la enfermedad

Para determinar el tiempo de duración de la enfermedad calculamos los días transcurridos entre el inicio de la enfermedad en términos de peso máximo

alcanzado, y el punto final artificial, atendiendo al momento de sacrificio del animal.

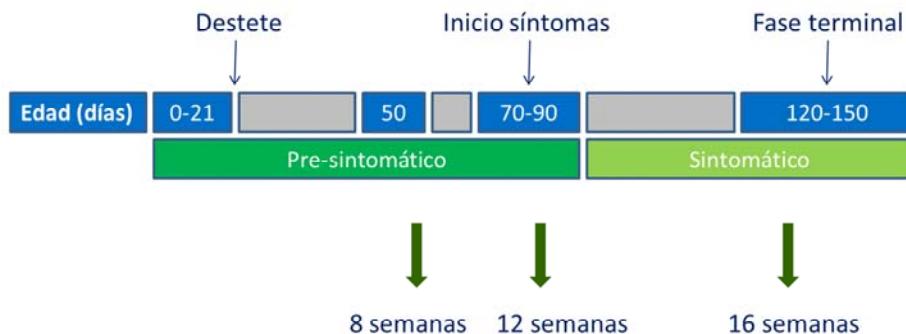


Figura 8. Línea del tiempo del modelo $SOD1^{G93A}$. Esquema sobre la progresión de la enfermedad en animales $SOD1^{G93A}$ (B6SJL-Tg($SOD1^{G93A}$)1Gur/J) y el manejo de dicho modelo empleado en el estudio de la ELA.

1.2. Colonia VIPKO

1.2.1. Animales experimentales

Los ratones *knock out* para VIP (VIP KO), B6.129S4-*Vip*^{tm1Clw}/J, con número de referencia 009640, proceden del laboratorio estadounidense *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA).

1.2.2. Establecimiento y mantenimiento de la colonia VIPKO

Para establecer la colonia de mutantes VIP se contó inicialmente con 5 hembras B6.129S4-Viptm1Clw/J. Cabe mencionar que esta cepa fue retirada para su conservación criogénica poco después de la compra, por lo que no fue posible adquirir ratones machos mutantes para expansión de la colonia. En su lugar se adquirieron ratones macho C57BL/6N a Charles River Laboratories International, Inc (Francia). Aunque el control recomendado por *The Jackson*

Laboratory para el ratón mutante VIP es el ratón C57BL/6 J, análisis posteriores hechos por el mismo laboratorio han demostrado que los ratones mutantes VIP donados por James Waschek a *The Jackson Laboratory* se encontraban en un fondo genético C57BL/6N. Aún con esta información se decidió retrocruzar por al menos 6 generaciones la cepa mutante, con enorme dificultad debido a la poca fertilidad de las hembras y alta mortalidad de las crías una vez que nacían.

En resumen, la colonia VIP se estableció cruzando hembras B6.129S4-*Vip*^{tm1Clw}/J con machos C57BL/6N (Charles River, France). Estos cruces se realizaron a lo largo de seis generaciones para garantizar el fondo genético. Una vez concluido, el mantenimiento de la colonia se realiza cruzando hembras y machos de las camadas obtenidas, animales heterocigotos (+/-) con animales *wild-type* (+/+).

1.2.3. Genotipado de ratones *knock out* para VIP

Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, se obtuvo el ADN genómico a partir de las colas de los ratones y se realizaron dos PCRs a cada uno de ellos siguiendo las instrucciones descritas por *Jackson Laboratory*. La enzima empleada fue la polimerasa *MyTaq hotstart taq polymerase* (Bioline, Londres, Reino Unido). Los oligonucleótidos usados fueron los siguientes: 8028 '5-TTA CCT GAT TCG TTT GCC AAT GAG TGA C-3', 8029 '5- TTT CAA GGT GTG GGG CTA GAG ACA TAC A-3', 8030 '5- GGC CCG GAG ATG AGG AAG AGG AGA ACA G-3'. Las condiciones de PCR fueron: 3 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; y 35 ciclos de 15 segundos desnaturalización a 95°C, 15 segundos de alineamiento a 62°C y 10 segundos de extensión a 72°C. Los oligos se usaron a una concentración final de 0.4 µM. Una de las reacciones de PCR incluye los oligonucleótidos 8028 y 8029, que amplificarán la banda *wild-type* con tamaño de 318bp; mientras que la otra reacción se lleva a cabo usando los

oligonucleótidos 8028 y 8030, para amplificar la banda mutante de 708bp. El genotipo se determina de acuerdo a tres patrones diferentes de amplificación de bandas: en el caso de los ratones nulos para VIP (VIP $-/-$, ausencia completa de VIP) se observa una única banda de 708 bp, en el caso de los ratones heterocigotos para VIP (VIP $+/-$, ausencia parcial de VIP) se observan dos bandas con tamaño de 708 bp y 318 bp respectivamente, y por último, en el caso de ratones silvestres (VIP $+/+$) se observa una única banda de 318 bp (Figura 9).

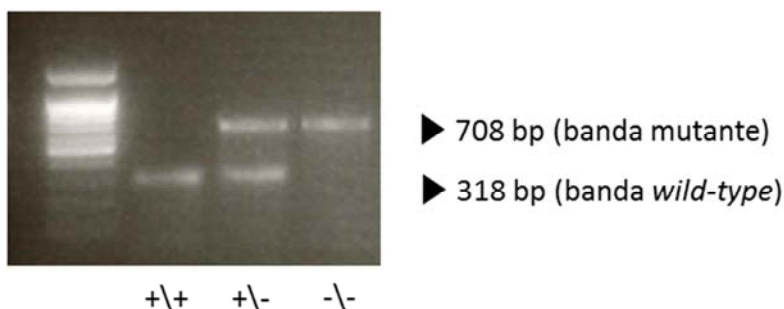


Figura 9. Genotipado de ratones mutantes para VIP. Interpretación de la PCR en gel de agarosa con bromuro de etidio para la asignación de genotipos.

2. Tratamiento con péptidos neuroprotectores e inmunomoduladores: VIP y NAP

Una vez genotipados los ratones, se seleccionaron las hembras transgénicas $SOD1^{G93A}$ de cada camada obtenida y se dividieron aleatoriamente en los respectivos grupos experimentales. Se exploraron diferentes aproximaciones terapéuticas:

2.1. Intervención pre-sintomática

2.1.1. Inyección intraperitoneal de los neuropéptidos VIP y NAP

Los animales (n=14) fueron tratados con una dosis de 10 nanomoles/ratón de VIP o NAP por vía intraperitoneal. La administración se realizó en días alternos, cada 48 horas, comenzando a partir del día 60 postnatal (\approx 8 semanas) (P60/8s), antes de la aparición de síntomas, y se continuó el tratamiento hasta el sacrificio ético del ratón debido a la progresión de la enfermedad, basándonos en los criterios de sacrificio previamente establecidos para el modelo animal. Los animales SOD1^{G93A} usados como controles fueron inyectados con amortiguador salino de fosfatos (PBS), vehículo empleado en la administración de los neuropéptidos (Tabla 4).

2.2. Intervención sintomática

2.2.1. Inyección intraperitoneal de los neuropéptidos VIP y NAP

Los animales (n=12) fueron tratados con una dosis de 10 nanomoles/ratón de VIP o NAP por vía intraperitoneal. La administración se realizó en días alternos, cada 48 horas, comenzando a partir del día 90 postnatal (\approx 12 semanas) (P90/12s), el inicio de la enfermedad descrito para el modelo. La administración se continuó hasta el sacrificio ético del animal como consecuencia de la progresión de la enfermedad, basándonos en los criterios de sacrificio previamente establecidos en el modelo animal. Los animales SOD1^{G93A} usados como controles fueron inyectados con amortiguador salino de fosfatos (PBS), vehículo empleado en la administración de los neuropéptidos (Tabla 4).

Cada intervención, tanto la aproximación pre-sintomática como la sintomática, incluyó tres grupos experimentales, ratones tratados con VIP, ratones tratados con NAP y ratones a los que se les administraba el vehículo, amortiguador salino de fosfatos (PBS), usados como control. En ambos casos se incluyó un grupo de ratones no portadores del transgen con el fin de usarlos como control de ganancia de peso y de evaluación de la función motora.

2.2.2. Inyección intraperitoneal de células mesenquimales murinas transducidas con el gen de VIP

La vida media del VIP en circulación es muy corta, por ello el empleo de células mesenquimales transducidas con el gen de VIP que mantienen niveles más sostenidos de este neuropéptido en circulación es una estrategia que permite prolongar la exposición al péptido y los efectos asociados al mismo. Para llevar a cabo este estudio se realizó una inyección intraperitoneal en el día 90 postnatal (≈ 12 semanas) (P90/12s), con una dosis única de 1×10^6 células mesenquimales murinas de médula ósea (MSCs) (Tabla 4).

Las células mesenquimales inyectadas fueron proporcionadas por el Dr. Francisco Martín (GENYO, Granada, España) (Cobo et al. 2013). Los vectores lentivirales fueron producidos en la línea celular humana de riñón 293T (CRL-11268, ATCC) con tres plásmidos. Se realiza una cuantificación mediante ELISA del número de copias de VIP y GFP que expresaban las células mesenquimales (Cobo et al. 2013). Las células empleadas en nuestro estudio expresaba 1,7 copias por célula.

Este estudio fue realizado con hembras SOD1^{G93A}, fueron 15 los animales incluidos en cada grupo experimental, siendo 3 los grupos experimentales incluidos en el estudio: i) hembras SOD1^{G93A} inyectadas con células mesenquimales murinas transducidas con el gen de VIP (MSCs-VIP); ii) hembras SOD1^{G93A} inyectadas con células mesenquimales murinas transducidas con GFP (MSCs-GFP), empleadas como control de transducción de VIP; y iii) hembras SOD1^{G93A} inyectadas con el vehículo (PBS), utilizadas como control de evolución de la enfermedad sin tratamiento con MSCs. Se empleó también un grupo de hembras no transgénicas como control del peso y de desempeño motor.

En todos los estudios realizados, los animales fueron evaluados semanalmente. El tipo de aproximación terapéutica realizada determina el momento en el que

se inicia el registro de datos de peso de los ratones, a las 9 semanas en el caso de realizar una intervención pre-sintomática o a las 11 semanas en caso de realizar una intervención sintomática. La monitorización de los ratones se hace más frecuente a medida que se acercan al punto final artificial de la enfermedad, con el fin de garantizar el control de la progresión de la enfermedad en el modelo animal.

Tabla 4. Resumen de las diferentes estrategias terapéuticas abordadas en nuestro estudio. Discontinuo= en días alternos, cada 48 horas; MSCs= células mesenquimales de médula ósea de ratón; i.p.= intraperitoneal.

Experimento	Tratamiento	Inicio administración	Pauta administración	Vía
VIP/NAP Pre-sintomático	VIP 10 nmol/animal NAP 10 nmol/animal	Día 60 postnatal (P60/8s)	Discontinuo	i.p.
VIP/NAP Sintomático	VIP 10 nmol/animal NAP 10 nmol/animal	Día 90 postnatal (P90/12s)	Discontinuo	i.p.
MSCs murinas (MSCs-VIP/MSCs-GFP) Sintomático	1x10 ⁶ células/animal	Día 90 postnatal (P90/12s)	Administración única	i.p.

3. Estudio de la biodistribución de células mesenquimales que sobreexpresan VIP

Para complementar el estudio realizado sobre animales SOD1^{G93A} tratados con MSCs de ratón que sobreexpresan VIP, se llevaron a cabo estudios de biodistribución con el fin de estudiar la localización de las células a diferentes

tiempos y determinar si las células empleadas presentan trayectorias diferenciales después de ser inyectadas intraperitonealmente.

3.1. Grupos experimentales

Se emplearon 15 ratones B6SJL-Tg(SOD1^{G93A})1Gur/J. Los animales estudiados fueron divididos en tres grupos experimentales: los inyectados con MSCs que sobreexpresaban VIP (n=6), los inyectados con MSCs-GFP (n=6) y el grupo empleado como control de fluorescencia (n=3) cuyos ratones fueron inyectados con amortiguador salino de fosfatos (PBS), vehículo empleado en las inyecciones de las células mesenquimales. Parte de los animales se emplearon en el estudio de seguimiento *in vivo* y el resto fueron empleados en el estudio *ex vivo*.

3.2. Marcaje células mesenquimales

Las MSCs se detectaron mediante marcaje fluorescente con el fin de estudiar su biodistribución. Para ello se incubaron con Alexa Fluor-750 éster de succinimidil (AF-750) adquirido en Invitrogen (Carlsbad, CA). Se preparó una solución de AF-750 2.5mM en PBS. Dicha solución fue incubada durante 30 minutos a 50°C y se mantuvo posteriormente a temperatura ambiente durante toda la noche para garantizar que se completase la hidrólisis del éster de succinimidil. El marcaje de las células se llevó a cabo incubándolas con AF-750 (0.1 mg/mL) durante 15 minutos a 37°C y 5% de CO₂, seguidamente se hicieron dos lavados con PBS para eliminar los restos de AF-750 y un lavado con Tris 10mM en PBS. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS a concentración 20x10⁶ células/mL.

3.3. Administración MSCs y estudio *in vivo*

Se realizó una administración única por vía intraperitoneal a las 12 semanas de edad, momento de inicio de los síntomas en el modelo animal SOD1^{G93A}, con el fin de simular las condiciones en las que se realizó el estudio en fase sintomática con dichas células mesenquimales. Se inyectaron 4×10^6 células por animal, 200 μ L de la suspensión celular anteriormente descrita (20×10^6 células/mL) vía intraperitoneal. La monitorización de las células marcadas se llevó a cabo empleando el sistema de análisis de imagen *in vivo* Xenogen IVIS® (Caliper Life Sciences Corp., Alameda, CA). Las imágenes se adquirieron y analizaron con el programa Living Image 2.5 (Caliper Life Sciences Corp.) usando los mismos ajustes de la cámara en todas las imágenes tomadas. Dichos ajustes fueron: *binning* = 4, tiempo de exposición = 5 segundos, campo de visión = 15, *f-stop* = 2 y filtros con excitación a 705-780 nm y emisión a 810-885 nm. Los datos se muestran en unidades de eficiencia y representan el ratio entre la luz emitida y la luz incidente. Los animales fueron sedados con isoflurano/oxígeno vía inhalatoria y colocados en posición decúbito supino para la adquisición de imágenes. Éstas se tomaron al momento de la inyección y en los siguientes 9 tiempos: 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h, 96h y 6 días.

3.4. Estudio *ex vivo*

Se llevó a cabo en ratones SOD1^{G93A} inyectados con células mesenquimales del modo anteriormente descrito. En esta ocasión los animales fueron sacrificados a las 12h y se les extrajeron los órganos principales (cerebro, riñones, bazo, corazón, hígado, tallo cerebral y columna vertebral con médula espinal) para comprobar si era posible detectar las células inyectadas. Se tomaron imágenes de los órganos empleando el Xenogen IVIS® (Caliper Life Sciences Corp., Alameda, CA), dichas imágenes se adquirieron y analizaron con el programa

Living Image 2.5 (Caliper Life Sciences Corp.), y los ajustes de la cámara y filtros de fluorescencia fueron los mismos en todas las imágenes. Seguidamente se analizó por citometría de flujo el homogeneizado de cada uno de los tejidos, empleando el modelo de citómetro FACs Calibur y el programa CellQuest Pro (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) para el análisis posterior.

4. Evaluación del papel fisiológico del péptido intestinal vasoactivo en el fenotipo de ratones transgénicos SOD1^{G93A}

Con el fin de obtener ratones SOD1^{G93A} deficientes de VIP se emplearon ratones B6SJL-Tg(SOD1^{G93A})1Gur/J, procedentes de la colonia iniciada en CABIMER y anteriormente descrita, y se adquirieron ratones hembra heterocigotas B6.129S4-Vip^{tm1Ciw}/J donadas por JA Waschek a *The Jackson Laboratory* (número de referencia 009640) (Bar Harbor, ME, USA). Los cruces se llevaron a cabo entre machos SOD1^{G93A} y hembras heterocigotas para VIP, las camadas obtenidas fueron genotipadas con el fin de seleccionar aquellos animales que expresasen el transgen humano SOD1^{G93A} y que carecieran total o parcialmente de VIP. A estos animales se les monitorizó el inicio y la progresión de la enfermedad, así como la supervivencia, con el fin evaluar la relevancia de VIP en el contexto de la esclerosis lateral amiotrófica.

Con el objetivo de obtener ratones que portasen el transgen SOD1^{G93A} y *knock out* para VIP, se cruzaron machos SOD1^{G93A} con hembras congénicas C57BL/6J heterocigotas para VIP (+/-) (Figura 10). Este cruce permitió obtener ratones SOD1^{G93A} heterocigotos VIP (+/-) y homocigotos VIP (+/+). Los animales no portadores del transgen SOD1^{G93A} (*Wild-type*) fueron empleados como controles de evolución de la enfermedad para los tres genotipos de VIP analizados, VIP (+/+), (+/-) y (-/-). Los ratones SOD1^{G93A} nulos para VIP (-/-) se obtuvieron a partir del cruce entre machos SOD1^{G93A} VIP (+/-) con hembras no

portadoras del transgen SOD1^{G93A} y heterocigotas para VIP (+/-). A partir de estos cruces se obtienen hasta seis genotipos diferentes:

1. *Wild-type* VIP +/+ = ratones no transgénicos, homocigotos VIP
2. *Wild-type* VIP +/- = ratones no transgénicos, heterocigotos VIP
3. *Wild-type* VIP -/- = ratones no transgénicos, nulos VIP
4. SOD1^{G93A} VIP +/+ = ratones transgénicos ELA, homocigotos VIP
5. SOD1^{G93A} VIP +/- = ratones transgénicos ELA, heterocigotos VIP
6. SOD1^{G93A} VIP -/- = ratones transgénicos ELA, nulos VIP

La obtención de los genotipos esperados sigue las leyes de segregación mendeliana de forma independiente para cada uno de los genes, tanto en el caso del transgen SOD1^{G93A} como en el caso del gen VIP. Este hecho dificulta lograr animales suficientes en un corto periodo de tiempo, siendo necesario obtener varias generaciones para poder tener un buen número de observaciones, por lo que conforme se obtenían los animales con los genotipos deseados se agrupaban en cohortes, en este caso, 5 cohortes (Figura 10). Los animales fruto de estos cruces se caracterizan por un fondo genético mixto. La evaluación del efecto de la ausencia de VIP en el modelo de ratón SOD1^{G93A} se llevó a cabo tanto en machos como en hembras, con el fin de estudiar si las observaciones obtenidas eran también dependientes del sexo.

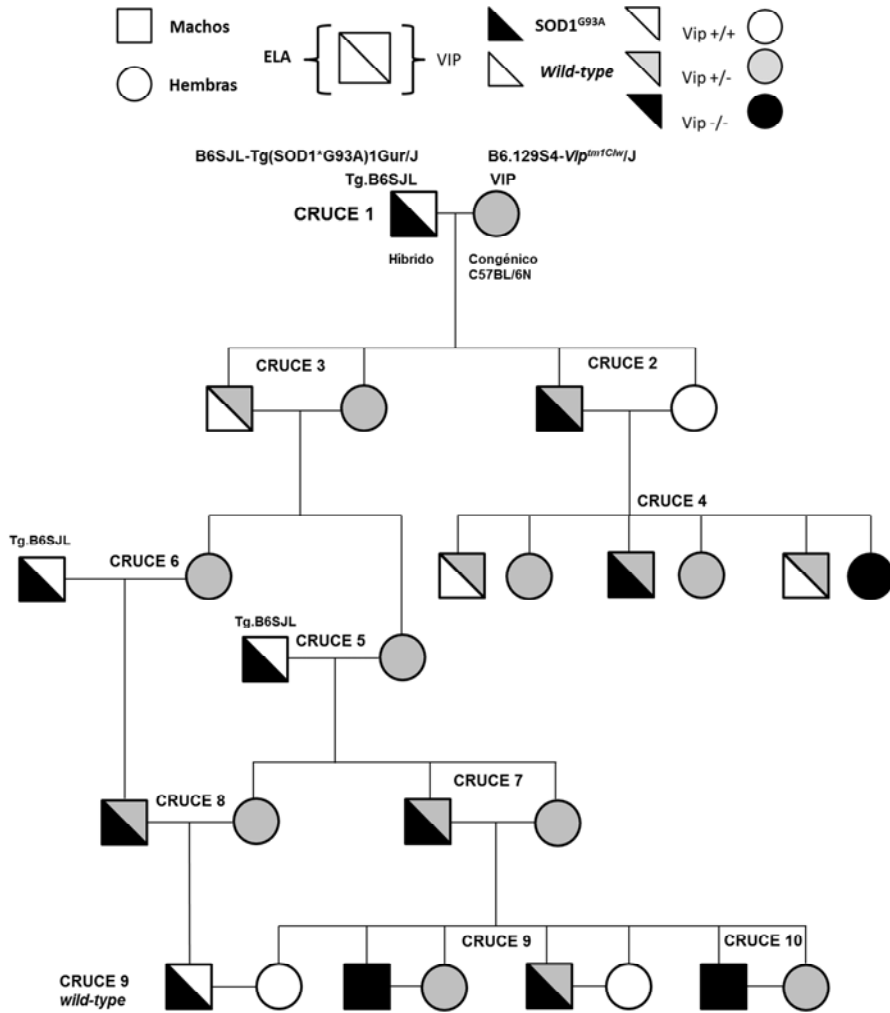


Figura 10. Linaje de los animales experimentales $SOD1^{G93A}$ carentes de VIP. Debido a la dificultad de obtener ratones $SOD1^{G93A}$ carentes de VIP en un fondo congénico C57BL/6N, fue necesario obtenerlos en un fondo híbrido. En la figura se muestran únicamente los genotipos empleados en los cruces de interés. El estudio se realizó con cuatro cohortes producto de los cruces indicados (Cohorte 1: Cruce 9; Cohorte 2: Cruces 8 y 9; Cohorte 3: Cruces 8 y 9, Cohorte 4: Cruces 8 y 10).

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico empleado tanto en la comparación de la evolución de los pesos corporales de los animales como en la comparación de los resultados derivados de prueba para el estudio del equilibrio y la coordinación (rota-rod) fue el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

El análisis de supervivencia y de momento de inicio de la enfermedad se realizó empleando el estimador estadístico no paramétrico llamado *Kaplan-Meier*; el estudio estadístico de las diferencias entre grupos experimentales se llevó a cabo mediante el método conocido como la prueba de Log-Rank (*Log-Rank Test*).

El análisis estadístico empleado para comparar los días transcurridos entre el inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal y el punto final artificial, fue la prueba U de Mann Whitney, prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes.

Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico SPSS (v22) donde * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.001$.

III. RESULTADOS

1. Tratamiento con péptidos neuroprotectores e inmunomoduladores: VIP y NAP

1.1. Intervención pre-sintomática

1.1.1. Inyección intraperitoneal de los neuropéptidos VIP y NAP

1.1.1.a. Monitorización de la evolución de peso

Cuando analizamos la ganancia de peso en ratones pre-sintomáticos tratados en días alternos con VIP y NAP por vía intraperitoneal a la dosis de 10nmol/ratón, no observamos diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control (Figura 11a).

1.1.1.b. Evaluación del equilibrio y la coordinación

Al analizar mediante el test de rota-rod la evolución de la pérdida de equilibrio y coordinación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales SOD1^{G93A} tratados y los controles SOD1^{G93A}, con excepción de la semana 20, donde se detectaron diferencias significativas entre el grupo tratado con VIP y el grupo control SOD1^{G93A} ($p=0.002$), así como entre el tratado con VIP y el tratado con NAP ($p=0.003$). Los ratones tratados con VIP exhibieron una menor pérdida en el desempeño motor que los tratados con NAP y el grupo control SOD1^{G93A}. En la semana 21 se mantienen dichas diferencias aunque no son estadísticamente significativas (Figura 11b).

1.1.1.c. Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia

Los datos de supervivencia hacen referencia a los días transcurridos entre el nacimiento del animal y el sacrificio ético del mismo; al analizar y comparar la

supervivencia de los animales de los diferentes grupos experimentales no observamos diferencias estadísticamente significativas (Figura 11c Gráfica insertada y Tabla 5).

Otro de los parámetros analizados fue el punto de inicio la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal, considerando como peso máximo aquel a partir del cual el animal sufre dos pérdidas consecutivas de peso. Cuando comparamos estos valores entre los diferentes grupos experimentales observamos que tanto el tratamiento con VIP (100.8 ± 2.6 días, $p=0.012$) como el tratamiento con NAP (92.8 ± 3.2 días, $p=0.002$) adelantan el inicio de la enfermedad de forma estadísticamente significativa cuando se les compara con el grupo control SOD1^{G93A} (105.9 ± 3.0 días) (Figura 11c y Tabla 5).

Por otra parte, el tiempo transcurrido entre el inicio de la enfermedad en base al peso máximo y el punto final artificial, es mayor en el grupo tratado con NAP (38.6 ± 4.0 días) respecto al control SOD1^{G93A} (25.4 ± 2.7 días) (Figura 11d). Los resultados ponen de manifiesto que el tratamiento con NAP alarga el periodo sintomático de la enfermedad en el modelo de forma significativa respecto a los animales SOD1^{G93A} sin tratar ($p=0.011$), este hecho podría reflejar que el tratamiento con NAP reduce la agresividad de avance de la enfermedad en el modelo, permitiendo a los animales vivir más tiempo con los síntomas asociados. En el caso del grupo tratado con VIP (30.5 ± 3.0 días), se observa una duración intermedia entre los dos grupos anteriores, pero carente de significancia estadística (Figura 11d y Tabla 5).

En resumen, el tratamiento con VIP y NAP iniciado en fase pre-sintomática (P60/8s) no modifica la supervivencia de los animales. Lo que se observa es que dichas moléculas bioactivas adelantan el inicio de la enfermedad determinado en base al peso máximo y paradójicamente reducen la velocidad de avance del

proceso patológico en el modelo, es decir, el tiempo transcurrido entre el inicio de la enfermedad y el punto final artificial se extiende.

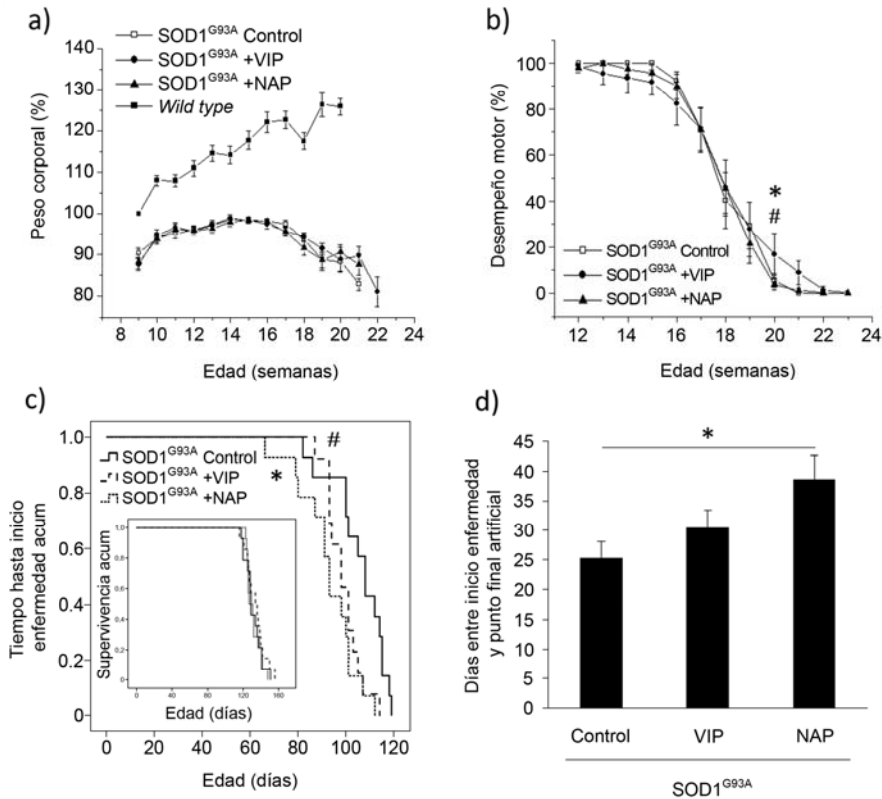


Figura 11. Inyección intraperitoneal de los neuropéptidos VIP y NAP en fase pre-sintomática, día 60 posnatal (P60/8s). Fueron cuatro los grupos experimentales evaluados: animales SOD1^{G93A} tratados con VIP, animales SOD1^{G93A} tratados con NAP, controles SOD1^{G93A} tratados con el vehículo y controles *wild-type*; cada grupo experimental constaba de 14 animales. a) Evolución de pesos corporales. Los valores se representan como la media \pm S.E.M. b) Evaluación del equilibrio y la coordinación mediante la prueba de rota-rod; (* $p \leq 0.05$) Diferencia entre el grupo tratado con VIP y el grupo tratado con NAP; (# $p \leq 0.05$) Diferencia entre el grupo tratado con VIP y el grupo control transgénico. El análisis estadístico fue realizado empleando el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Los valores se representan como la media \pm S.E.M. c) Momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal; (* $p \leq 0.05$) Diferencia entre el grupo control transgénico y el grupo tratado con NAP; (# $p \leq 0.05$) Diferencia entre el grupo control transgénico y el grupo tratado con VIP. Gráfica insertada: Evaluación de la supervivencia, tiempo transcurrido entre el nacimiento del animal y el punto final artificial. El análisis de supervivencia y de momento de inicio de la enfermedad se realizó empleando el estimador estadístico no paramétrico llamado *Kaplan-Meier*; el estudio estadístico de las diferencias entre grupos experimentales se llevó a cabo mediante el método conocido como la prueba de Log-Rank. d) Tiempo transcurrido entre el momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal y el punto final artificial (* $p \leq 0.05$). El análisis estadístico fue realizado empleando la prueba U de Mann Whitney aplicada a dos muestras independientes. Los valores se representan como la media \pm S.E.M.

1.2. Intervención sintomática

1.2.1. Inyección intraperitoneal de los neuropéptidos VIP y NAP

1.2.1.a. Monitorización de la evolución de peso

Cuando analizamos la ganancia de peso en ratones sintomáticos tratados en días alternos con VIP y NAP por vía intraperitoneal a la dosis de 10nmol/ratón, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo control (Figura 12a). Excepto en la semana 19, donde se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control de ratones SOD1^{G93A} y el grupo de ratones tratados con NAP ($p=0.037$), presentando los ratones tratados con NAP una mayor pérdida de peso. Cuando se compara el grupo control SOD1^{G93A} con el grupo tratado con VIP se observa la misma tendencia pero no alcanza significancia estadística ($p=0.081$) (Figura 12a).

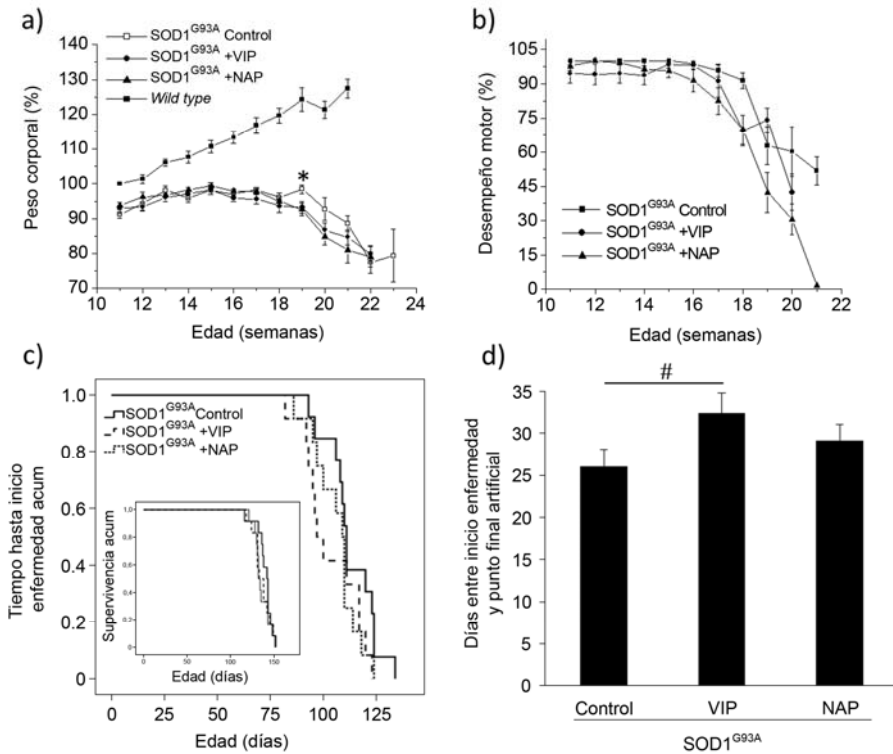


Figura 12. Inyección intraperitoneal de los neuropéptidos VIP y NAP en fase sintomática, día 90 posnatal (P90/12s). Fueron cuatro los grupos experimentales evaluados: animales SOD1^{G93A} tratados con VIP, animales SOD1^{G93A} tratados con NAP, controles SOD1^{G93A} tratados con el vehículo y controles *wild-type*; cada grupo experimental constaba de 12 animales. a) Evolución de pesos corporales. Los valores se representan como la media \pm S.E.M. El análisis estadístico fue realizado empleando el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples; (*) Diferencia entre el grupo tratado con NAP y el grupo de animales transgénicos tratados con el vehículo. b) Evaluación del equilibrio y la coordinación mediante la prueba de rota-rod. c) Momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal. Gráfica insertada: Evaluación de la supervivencia, tiempo transcurrido entre el nacimiento del animal y el punto final artificial. d) Tiempo transcurrido entre el momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal y el punto final artificial (# $p \leq 0.05$). El análisis

estadístico fue realizado empleando la prueba U de Mann Whitney aplicada a dos muestras independientes. Los valores se representan como la media \pm S.E.M.

1.2.1.b. Evaluación del equilibrio y la coordinación

Al analizar mediante el test de rota-rod la evolución de la pérdida de equilibrio y coordinación no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados y los controles SOD1^{G93A}. Sin embargo, la tendencia observada es la de un deterioro más rápido del equilibrio y la coordinación en los animales tratados con VIP y aún más en los tratados con NAP (Figura 12b).

1.2.1.c. Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia

Los datos de supervivencia (que referencian los días transcurridos entre el nacimiento del animal y el sacrificio ético del mismo), no arrojan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales analizados (Figura 12c Gráfica insertada y Tabla 5).

Cuando se analiza el momento de inicio de la enfermedad determinado en base al peso máximo alcanzado por el animal, se observa que aunque la diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$), tanto el tratamiento con VIP como el tratamiento con NAP adelantan el inicio de la enfermedad (Figura 12c). En el grupo de animales tratados con VIP se adelanta 10 días (103 ± 3.8 días) con respecto a la media observada en el grupo de los animales controles SOD1^{G93A} (113 ± 3.2 días). Al analizar las diferencias obtenidas en el caso del grupo tratado con NAP, observamos que se adelanta 7 días el inicio de la enfermedad (106.6 ± 3.0 días) respecto al grupo control SOD1^{G93A} (113 ± 3.2 días) (Figura 12c y Tabla 5).

Por otra parte, al analizar el tiempo transcurrido entre el inicio de la enfermedad, en base al peso máximo alcanzado por el animal, y el punto final artificial se encontró que dicho tiempo era significativamente superior en el caso de los animales tratados con VIP (32.4 ± 2.4 días) en comparación con en el grupo de animales control SOD1^{G93A} (26.1 ± 2.0 días) ($p=0.050$) (Figura 12d y Tabla 5). Los animales tratados con NAP (29.2 ± 1.9 días) también sobrevivían más que los controles SOD1^{G93A}, pero esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa (Figura 12d y Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de los resultados derivados de las diferentes estrategias terapéuticas abordadas en nuestro estudio.

Aproximación terapéutica	Neuropeptido	Número de animales	Media de supervivencia (días)	Tiempo hasta inicio enfermedad en base al peso máximo (días)	Tiempo duración enfermedad (días)
Intervención pre-sintomática (P60/8s)	VIP	14	134.1 ± 2.9	100.9 ± 2.6	30.5 ± 3.01
	NAP	14	131.4 ± 2.1	92.8 ± 3.2	38.6 ± 4.0
	Vehículo-PBS	14	131.3 ± 2.5	105.9 ± 3.0	25.4 ± 2.6
Intervención sintomática (P90/12s)	VIP	12	136.0 ± 2.9	103.6 ± 3.8	32.4 ± 2.4
	NAP	12	135.7 ± 2.6	106.6 ± 3.0	29.2 ± 1.9
	Vehículo-PBS	12	139.7 ± 2.7	113.0 ± 3.2	26.1 ± 2.0
	MSCs-VIP	15	148.1 ± 8.1	108.3 ± 1.7	27.5 ± 2.4
	MSCs-GFP	15	136.9 ± 3.4	106.5 ± 2.4	29.4 ± 2.2
	Vehículo-PBS	15	135.7 ± 2.6	107.7 ± 1.6	27.0 ± 2.2

Tiempo duración enfermedad (días): tiempo transcurrido entre el momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado y el sacrificio ético del animal (punto final artificial).

En resumen, el tratamiento con VIP y NAP iniciado en fase sintomática (P90/12s) no modifica la supervivencia de los animales SOD1^{G93A}. Se observa

que adelanta el inicio de la enfermedad en base al peso máximo aunque dicha tendencia carece de significancia estadística, quizás debido a que el tratamiento coincide con el inicio de los síntomas. Sin embargo, dicho tratamiento reduce la velocidad de avance de la enfermedad, es decir, el tiempo transcurrido entre el inicio de la enfermedad y el punto final artificial se extiende.

1.2.2. Efecto de la inyección intraperitoneal de células mesenquimales que sobreexpresan VIP

1.2.2.a. Monitorización de la evolución de peso

Fueron tres los grupos experimentales observados y comparados: animales controles SOD1^{G93A}, animales SOD1^{G93A} tratados con una dosis única de MSCs que expresan GFP (MSCs-GFP) y un tercer grupo de animales SOD1^{G93A} tratados con mesenquimales transducidas con un vector lentivírico para sobreexpresión de VIP (MSCs-VIP). Evaluamos de este modo el potencial terapéutico de las MSCs per se y de las MSCs que sobreexpresan VIP.

Al analizar la evolución de pesos observamos que los tratamientos no afectaban a la pérdida progresiva de peso característica del modelo SOD1^{G93A}. Cabe destacar que en la semana 18 el grupo de animales inyectados con MSCs-GFP presenta una pérdida de peso estadísticamente significativa en comparación con el grupo control transgénico ($p=0.023$) (Figura 13a). Sin embargo, estos resultados reflejarían la exclusión de dos de los animales del grupo tratado con MSCs-VIP que presentan una inusual prolongación de la supervivencia (Figura 13a).

Cuando analizamos la evolución de los pesos corporales de estos dos animales (MSCs-VIP #a y #b), se hizo evidente la dificultad de establecer un peso máximo para los mismos, considerando como peso máximo aquel a partir del cual el

animal sufre dos pérdidas consecutivas de peso, ya que sus pesos oscilaban entre el 85-100% respecto al peso inicial, no se observó la caída de los mismos típica del modelo SOD1^{G93A} (Figura 13a). En la figura 13a se representa la evolución de pesos de dichos animales de forma independiente. Este comportamiento se mantuvo hasta el sacrificio ético de los animales, ya que cumplían uno de los otros dos criterios a tener en cuenta para proceder al sacrificio del animal.

Cuando los animales MSCs-VIP #a y #b se incluyen en el análisis de evolución de pesos, el estudio estadístico arroja más diferencias significativas. Al comparar el grupo de controles SOD1^{G93A} con el grupo de animales tratados con MSCs-GFP, observamos que a las semanas 18 y 19 la pérdida de peso es menor en los tratados con células mesenquimales ($p=0.024$ y $p=0.057$, respectivamente). El grupo de animales tratados con MSCs-VIP presenta una menor pérdida de peso en la semana 14 en comparación con el grupo de controles SOD1^{G93A} ($p=0.023$). Los tratamientos con los dos tipos de células mesenquimales también muestran diferencias, concretamente en la semana 17 ($p=0.053$) en la 18 ($p=0.056$), donde observamos que el grupo de animales tratados con MSCs-GFP presenta, en términos de promedio, menor pérdida de peso que el grupo que fue tratado con MSCs-VIP (Figura 13a).

1.2.2.b. Evaluación del equilibrio y la coordinación

Al analizar mediante el test de rota-rod la evolución de la pérdida de equilibrio y de coordinación sin tener en cuenta a los dos animales del grupo tratado con MSCs-VIP, que presentaban una evolución diferente al resto de animales del grupo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados y los controles SOD1^{G93A} (Figura 13b). Excepto en la semana 21, donde los animales tratados con MSCs-VIP mostraron un desempeño motor ligeramente superior al observado en el grupo de animales tratados con MSCs-

GFP ($p=0.054$). Curiosamente los dos animales que sobrevivieron más que el resto conservaron hasta la semana 27 y 28, respectivamente, el 100% del desempeño motor, tal y como se observa en la figura 13b, donde la evolución de dichos animales ha sido representada de forma independiente.

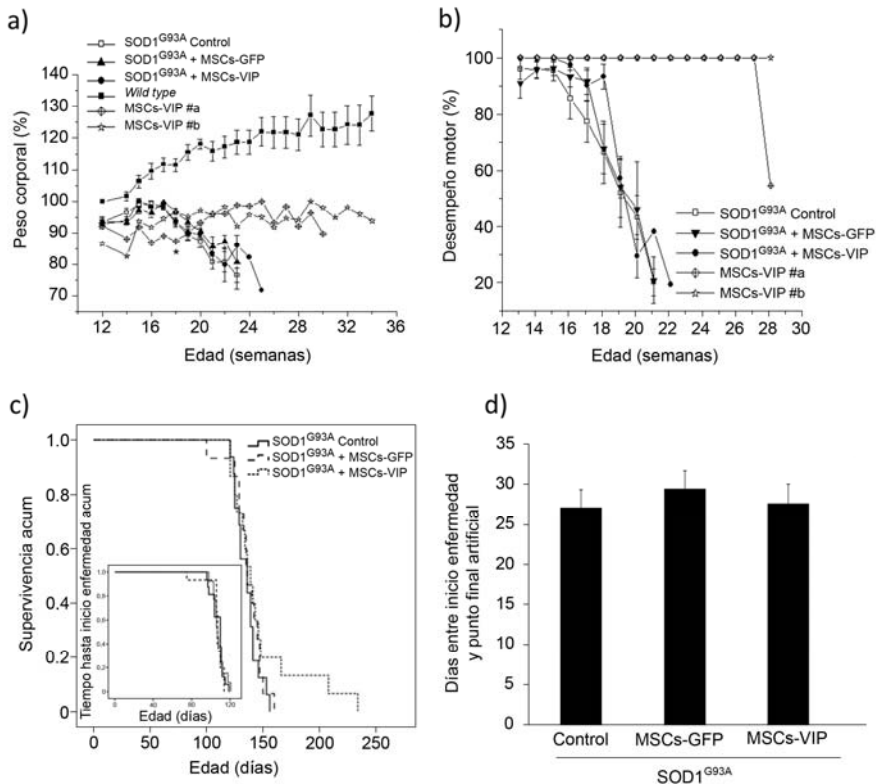


Figura 13. Inyección intraperitoneal de células mesenquimales de médula ósea (MSCs) procedentes de ratones en fase sintomática, día 90 posnatal (P90/12s). Los ratones $SOD1^{G93A}$ recibieron una dosis única de 1×10^6 MSCs. Fueron cuatro los grupos experimentales evaluados: animales $SOD1^{G93A}$ tratados con MSCs que sobreexpresaban VIP (MSCs-VIP), animales $SOD1^{G93A}$ tratados con MSCs marcadas con GFP (MSCs-GFP), controles $SOD1^{G93A}$ y controles *wild-type*; cada grupo experimental constaba de 15 animales. a) Evolución de pesos corporales. Los valores se representan como la media \pm S.E.M. Se representan de forma independiente dos animales tratados con MSCs-VIP que presentaron un patrón de evolución de pesos diferente al resto de animales de

dicho grupo experimental (MSCs-VIP #a y MSCs-VIP #b). b) Evaluación del equilibrio y la coordinación mediante la prueba de rota-rod. Los valores se representan como la media \pm S.E.M. Se representan de forma independiente dos animales tratados con MSCs-VIP que presentaron un patrón de evolución de pesos diferente al resto de animales de dicho grupo experimental (MSCs-VIP #a y MSCs-VIP #b). c) Evaluación de la supervivencia, tiempo transcurrido entre el nacimiento del animal y el punto final artificial. Gráfica insertada: Momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal. d) Tiempo transcurrido entre el momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal y el punto final artificial.

1.2.2.c. Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia

Como ya se mencionó previamente, dos de los animales del grupo tratado con MSCs-VIP exhibieron un aumento significativo en su supervivencia, 208 y 234 días respectivamente (Figura 13c). Cuando incluimos a dichos animales en el análisis de la media de supervivencia se evidencia un importante aumento de la misma (145.73 ± 6.54 días) respecto a grupo control SOD1^{G93A} (135.68 ± 2.57 días) y al grupo de animales tratados con MSCs-GFP (136.86 ± 3.45 días). Sin embargo, dicha diferencia no alcanza a ser estadísticamente significativa (Figura 13c y Tabla 5).

El análisis del momento de inicio de la enfermedad entre los diferentes grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas. Así como tampoco fueron significativas las diferencias observadas en cuanto al tiempo transcurrido entre el momento de inicio de la enfermedad y el sacrificio ético del animal (Figura 13c Gráfica insertada, Figura 13d y Tabla 5).

En resumen, aunque el análisis de la supervivencia considerando todos los animales tratados con MSCs-VIP no arroja diferencias estadísticamente significativas, dos de los animales del grupo tratado con MSCs-VIP exhibieron

un aumento significativo en su supervivencia, 208 y 234 días respectivamente. No se observan diferencias evidentes en cuanto al análisis del momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo y en cuanto al tiempo transcurrido entre el momento de inicio de la enfermedad y el punto final artificial.

2. Estudio de biodistribución de células mesenquimales

2.1. Estudio *in vivo*

La biodistribución de las células mesenquimales de médula ósea de ratón (MSCs) fue analizada por fluorescencia en infrarrojo cercano.

Se realizó una monitorización a diferentes tiempos, prologándose hasta los 6 días después de haber realizado la inyección de las células mesenquimales. Los resultados muestran que a partir de las 48 horas post-administración, las células inyectadas se detectan en menor medida en el área intraperitoneal, tanto en el caso de las MSCs-GFP como en el caso de las MSCs-VIP. A las 96 horas post-administración se observa cierta fluorescencia aunque muy leve en el área intraperitoneal, en ambos tratamientos (Figura 14 y Figura 15), lo que explica la actividad trópica elevada de las mismas.

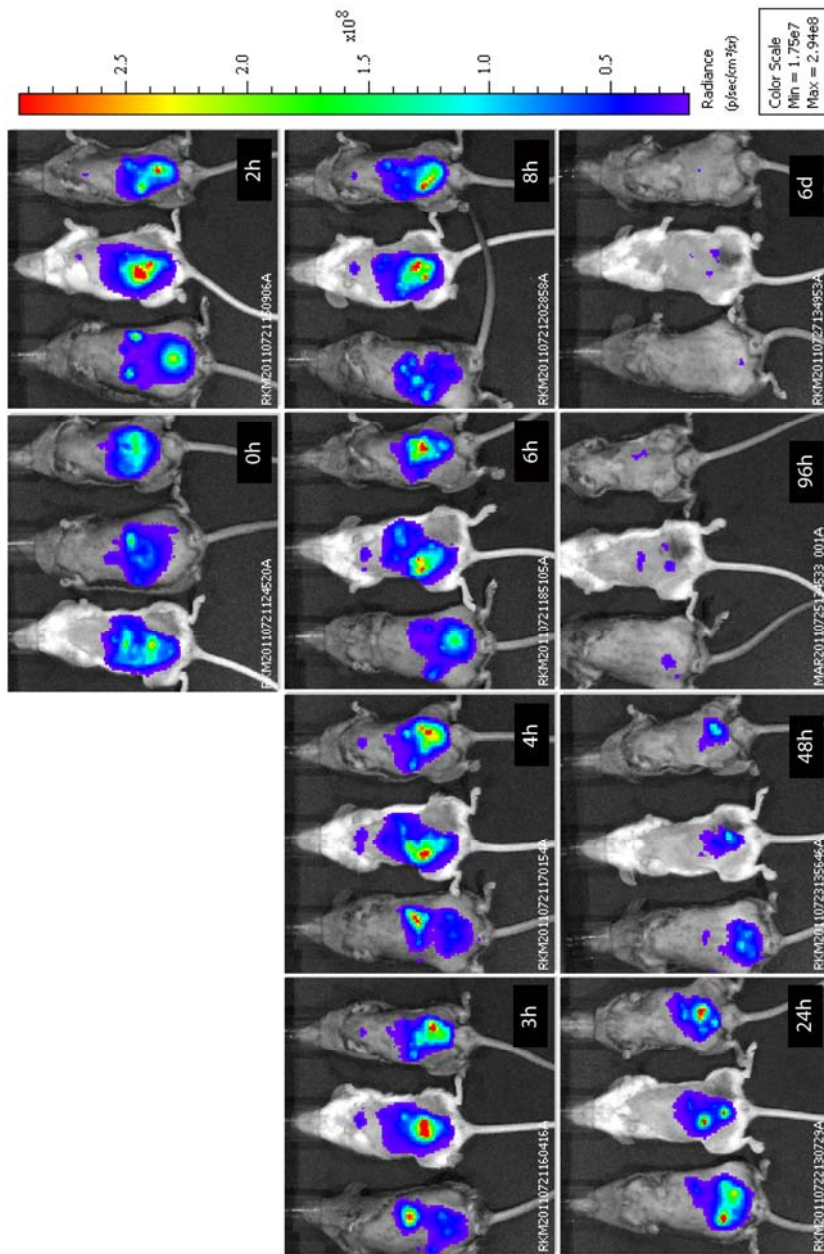


Figura 14. Estudio de biodistribución de células mesenquimales de médula ósea de ratón que sobreexpresaban VIP (MSCs-VIP). Las MSCs-VIP fueron inyectadas vía intraperitoneal en animales SOD1^{G93A} y analizamos su biodistribución por fluorescencia en infrarrojo cercano. Fueron tres los animales empleados en el estudio (n=3). La

monitorización se realizó a diferentes tiempos: justo tras realizar la inyección (0h) y a las 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48, 96 horas y a los 6 días tras la inyección.

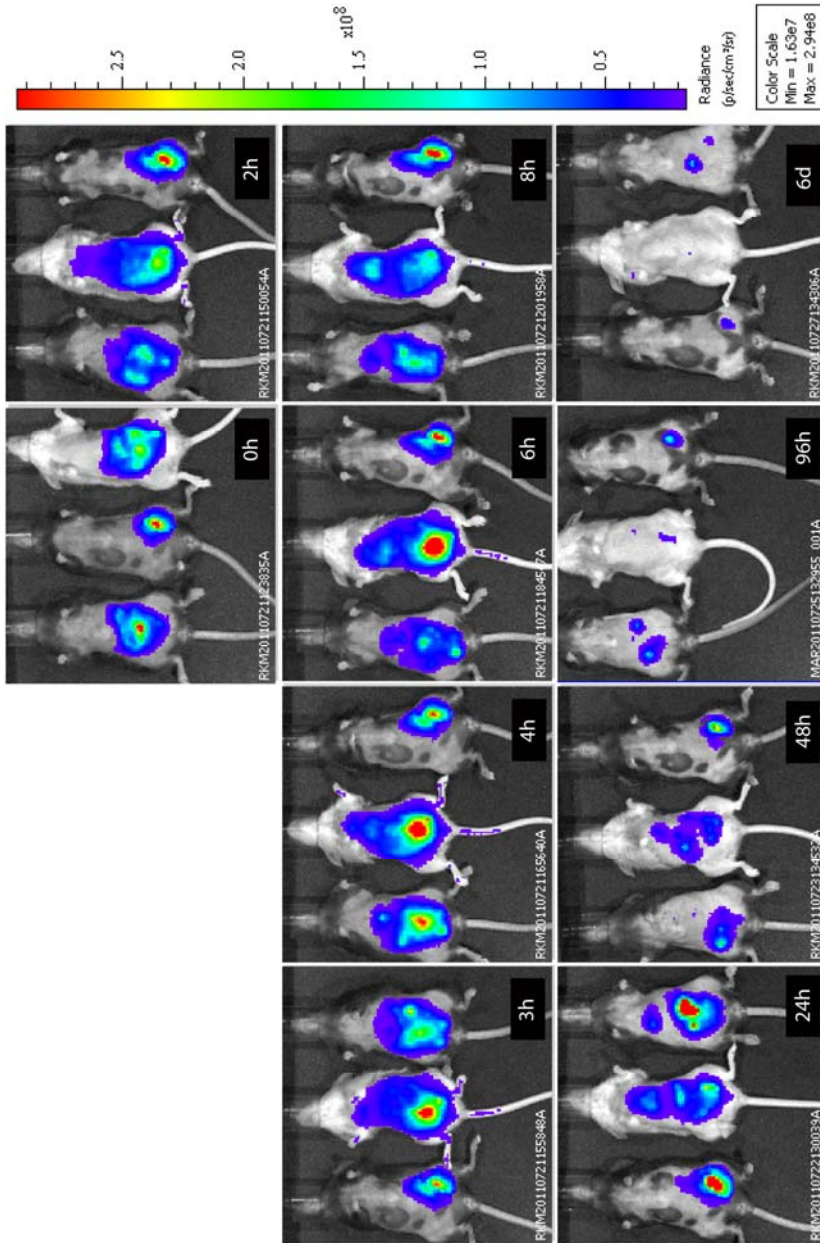


Figura 15. Estudio de biodistribución de células mesenquimales de médula ósea de ratón empleadas como controles de la actividad propia de dichas células (MSCs-GFP).

Las MSCs-GFP fueron inyectadas vía intraperitoneal en animales SOD1^{G93A} y analizamos su biodistribución por fluorescencia en infrarrojo cercano. Fueron tres los animales empleados en el estudio (n=3). La monitorización se realizó a diferentes tiempos: justo tras realizar la inyección (0h) y a las 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48, 96 horas y a los 6 días tras la inyección.

2.2. Estudio ex vivo

Con el fin de comprobar si era posible detectar las células inyectadas en otras localizaciones 12 horas después de haber realizado la administración intraperitoneal; los animales fueron anestesiados y sacrificados para proceder a la extracción de órganos de interés: cerebro, riñones, bazo, corazón, hígado, tallo cerebral y columna vertebral con médula espinal. Los resultados muestran que es posible detectar células en los riñones, así como en el bazo de los animales (Figura 16). Comprobamos así que las células inyectadas no permanecen estáticas en el área de inyección, pocas horas después de haber realizado la inyección de células mesenquimales es posible detectarlas en otras regiones (Figura 16).

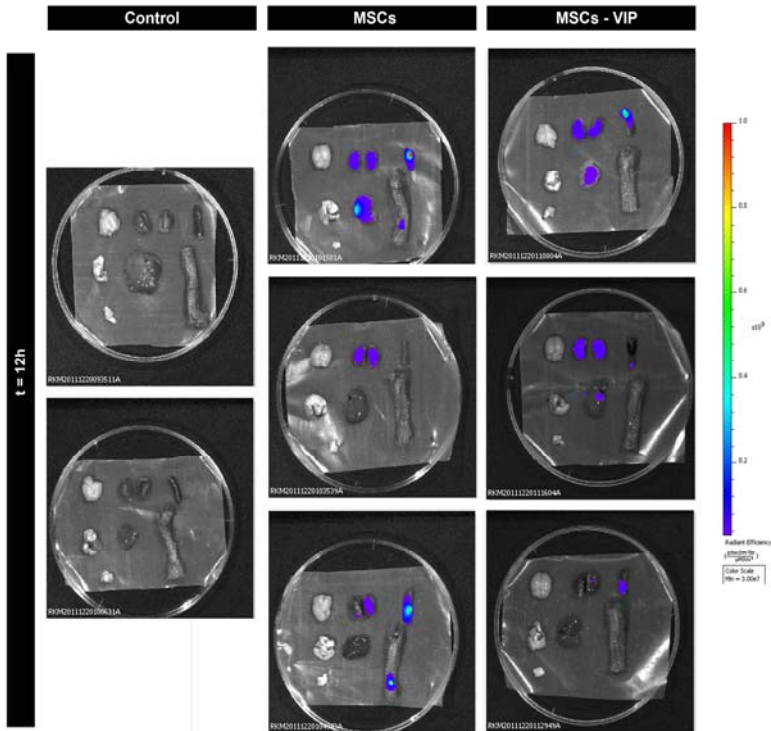


Figura 16. Estudio de biodistribución sobre órganos extraídos de animales $SOD1^{G93A}$ inyectados con células mesenquimales de médula ósea de ratón (MSCs). La medición se realizó por fluorescencia en infrarrojo cercano. Se realizó 12 horas después de la inyección intraperitoneal. De izquierda a derecha: cerebro, riñones, bazo, corazón, hígado, tallo cerebral y columna vertebral con médula espinal.

3. Evaluación del papel fisiológico del péptido intestinal vasoactivo en el fenotipo de ratones transgénicos $SOD1^{G93A}$

3.1. Hembras

Fueron seis los genotipos analizados:

- a. *Wild-type* VIP +/+
- b. *Wild-type* VIP +/-

- c. *Wild-type* VIP -/-
- d. SOD1^{G93A} VIP +/+
- e. SOD1^{G93A} VIP +/-
- f. SOD1^{G93A} VIP -/-

3.1.1. Monitorización de la evolución de peso

Comprobamos, que en el caso de las hembras SOD1^{G93A}, la ganancia de peso era independiente del genotipo para VIP (Figura 17a). Sin embargo, al analizar la evolución de pesos en las hembras no portadoras del transgen, controles para los animales SOD1^{G93A}, los resultados obtenidos arrojaban diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes genotipos para VIP (Figura 17b). En ratones no transgénicos la ausencia de VIP (VIP -/-) afecta a la ganancia de peso, desde la semana 8 de edad se observa una tendencia hacia una menor ganancia de peso cuando estas hembras son comparadas con las heterocigotas para VIP (VIP +/-) y con el grupo control para VIP (VIP +/+); la diferencia entre hembras *wild-type* VIP -/- y hembras *wild-type* VIP +/- se hace estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) a partir de la semana 16, manteniéndose hasta que los animales son sacrificados con 26 semanas (Figura 17b).

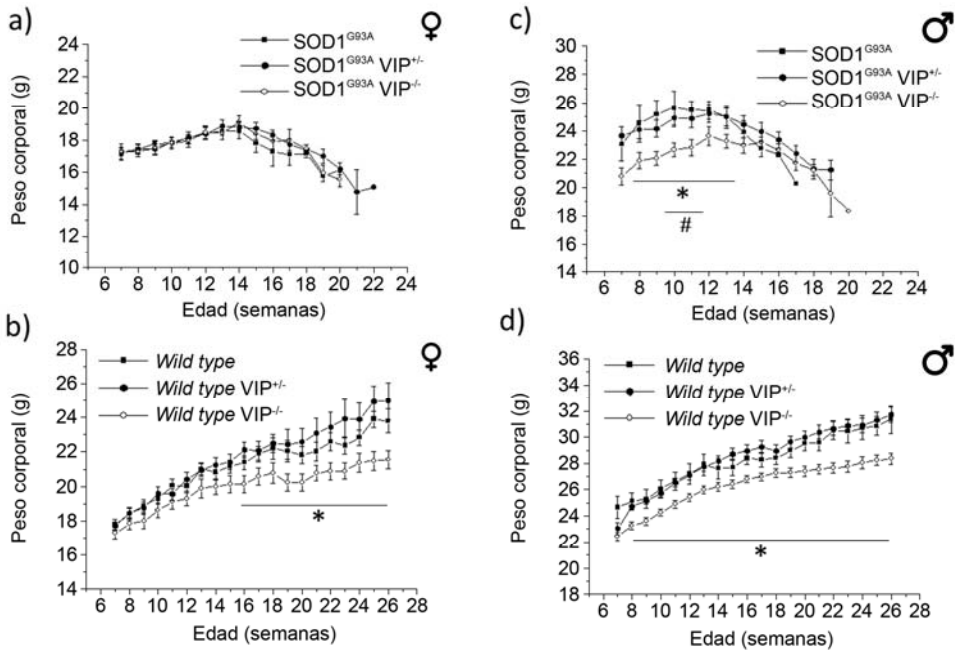


Figura 17. Estudio de evolución de pesos corporales de animales $SOD1^{G93A}$ y *wild-type* en ausencia parcial o total de VIP endógeno. a) Hembras $SOD1^{G93A}$ carentes de VIP endógeno ($VIP^{+/-}$ y $VIP^{-/-}$) y hembras $SOD1^{G93A}$ controles para VIP. b) Hembras *wild-type*, no transgénicas, carentes de VIP endógeno ($VIP^{+/-}$ y $VIP^{-/-}$) y hembras *wild-type* controles para VIP. (*) Diferencias entre el grupo de hembras $VIP^{+/-}$ y el grupo $VIP^{-/-}$. c) Machos $SOD1^{G93A}$ carentes de VIP endógeno ($VIP^{+/-}$ y $VIP^{-/-}$) y machos $SOD1^{G93A}$ controles para VIP. (*) Diferencias entre el grupo de machos $VIP^{+/-}$ y el grupo $VIP^{-/-}$; (#) Diferencias entre el grupo de machos $VIP^{+/+}$ y el grupo $VIP^{-/-}$. d) Machos *wild-type* carentes de VIP endógeno ($VIP^{+/-}$ y $VIP^{-/-}$) y machos *wild-type* controles para VIP. (*) Diferencias entre el grupo de machos $VIP^{+/-}$ y el grupo $VIP^{-/-}$. El análisis estadístico para comparar la evolución de pesos entre los diferentes grupos experimentales fue realizado empleando el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples (*/# $p \leq 0.05$).

3.1.2. Evaluación del equilibrio y la coordinación

Al analizar mediante el test de rota-rod la evolución de la pérdida de equilibrio y de coordinación encontramos importantes variaciones entre los diferentes grupos experimentales, este hecho se tradujo en una amplia dispersión estadística de los datos. Al realizar el estudio estadístico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 18a).

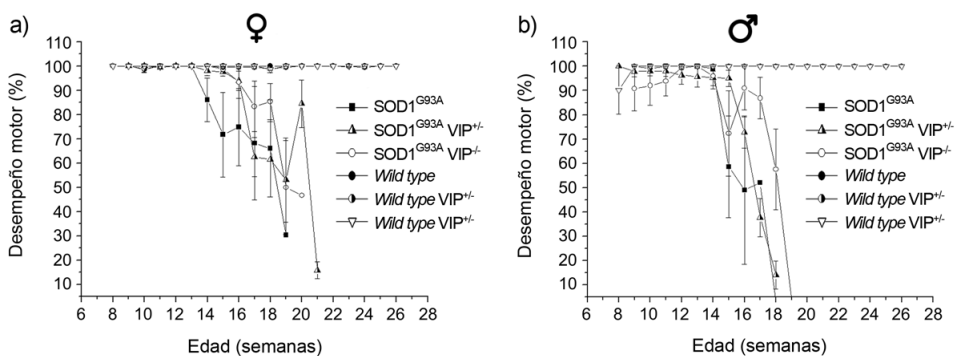


Figura 18. Evaluación del equilibrio y la coordinación en animales SOD1^{G93A} y wild-type en ausencia parcial o total de VIP endógeno. a) Hembras SOD1^{G93A} y hembras wild-type, carentes de VIP endógeno (VIP^{+/-} y VIP^{-/-}) y controles para VIP. b) Machos SOD1^{G93A} y machos wild-type, carentes de VIP endógeno (VIP^{+/-} y VIP^{-/-}) y controles para VIP.

3.1.3. Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia

Los datos de supervivencia obtenidos nos muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales estudiados, la ausencia de VIP no modifica la supervivencia asociada a las hembras SOD1^{G93A} (Figura 19a Gráfica insertada y Tabla 6).

El análisis del momento de inicio de la enfermedad en base al punto en el que el ratón alcanza el peso máximo muestra que, en ausencia de VIP, tanto las

hembras VIP +/- como las VIP -/-, ven retrasado dicho inicio (100.29 ± 22.08 y 102.07 ± 2.22 días, respectivamente) en comparación con las hembras $SOD1^{G93A}$ control para VIP (VIP +/+) (94.8 ± 4.55 días), aunque dicha tendencia no es estadísticamente significativa (Figura 19a y Tabla 6).

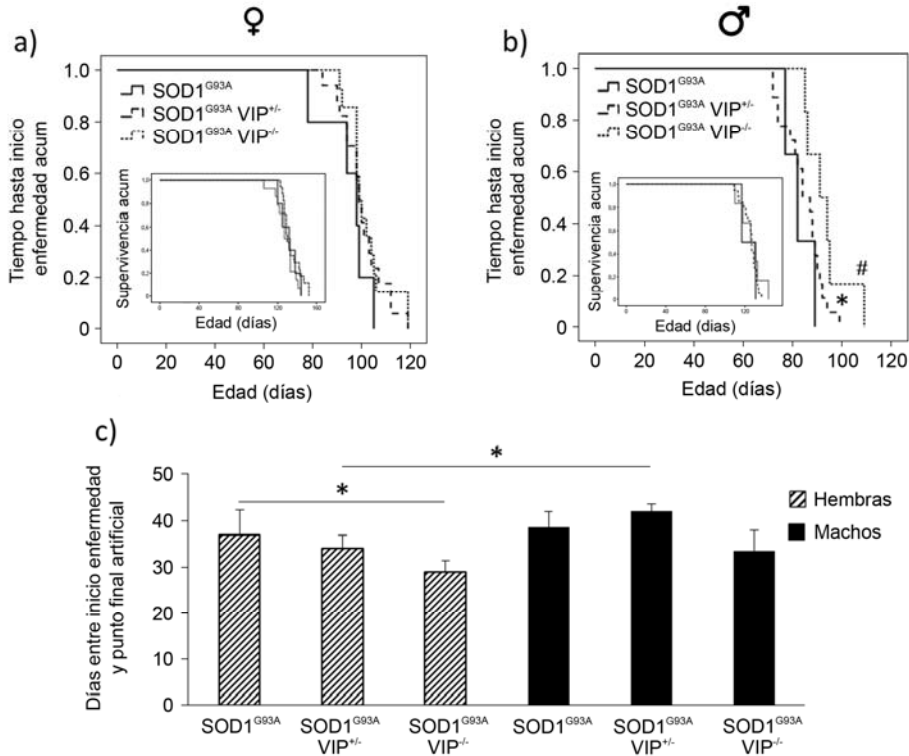


Figura 19: Evaluación del momento de inicio de la enfermedad, de la supervivencia y de los días transcurridos entre el momento de inicio de la enfermedad y el punto final artificial en animales $SOD1^{G93A}$ en ausencia parcial o total de VIP endógeno. a) Evaluación del momento de inicio de la enfermedad y de la supervivencia de hembras $SOD1^{G93A}$ en ausencia parcial o total de VIP endógeno. b) Evaluación del momento de inicio de la enfermedad y de la supervivencia de machos $SOD1^{G93A}$ en ausencia parcial o total de VIP endógeno. El análisis estadístico del momento de inicio de la enfermedad se realizó empleando el estimador estadístico no paramétrico llamado *Kaplan-Meier* y la prueba de Log-Rank. (* $p \leq 0.05$) Diferencia entre el grupo de animales VIP -/- y el grupo VIP +/- (# $p \leq 0.05$) Diferencia entre el grupo de animales VIP -/- y el grupo control

para VIP. c) Días transcurridos entre el momento de inicio de la enfermedad y el punto final artificial en hembras y machos SOD1^{G93A} en ausencia parcial o total de VIP endógeno. En el estudio estadístico se aplicó la llamada prueba U de Mann Whitney aplicada a dos muestras independientes; (* $p \leq 0.05$).

Cuando analizamos los tiempos transcurridos desde el momento de inicio de la enfermedad hasta el punto final artificial en las hembras SOD1^{G93A}, observamos que la ausencia completa de VIP (VIP -/-) se asocia a una duración más corta de dicho periodo (28.93 ± 2.51 días), siendo estadísticamente significativa la diferencia cuando se compara con el grupo de hembras SOD1^{G93A} VIP +/+ (37 ± 5.24 días) ($p=0.049$) (Figura 19c y Tabla 6). Aunque no alcanza significancia estadística cabe destacar que en ausencia parcial de VIP (VIP +/-) se observa una tendencia similar (34 ± 2.81 días) (Figura 19c y Tabla 6).

En resumen, al analizar los datos referentes a las hembras SOD1^{G93A} carentes de VIP observamos que la carencia de dicho neuropéptido no afecta a la supervivencia de los animales. En relación al momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado, los resultados muestran que la carencia de VIP retrasa dicho inicio, aunque la tendencia observada carece de significancia estadística. Por último, en cuanto al tiempo transcurrido entre el momento de inicio de la enfermedad y el punto final artificial cabe mencionar que la carencia completa de VIP hace que la enfermedad avance con mayor velocidad, dicho periodo de tiempo se ve reducido. En ausencia parcial de VIP se observa una tendencia similar.

3.2. Machos

Fueron seis los genotipos analizados:

- a. *Wild-type* VIP +/+
- b. *Wild-type* VIP +/-
- c. *Wild-type* VIP -/-
- d. SOD1^{G93A} VIP +/+
- e. SOD1^{G93A} VIP +/-
- f. SOD1^{G93A} VIP -/-

3.2.1. Monitorización de la evolución de peso

Al analizar la evolución de los pesos en los machos SOD1^{G93A} observamos que en ausencia completa de VIP (VIP -/-) tanto el peso basal como la ganancia de peso es menor a la observada en los animales SOD1^{G93A} VIP +/- y SOD1^{G93A} VIP +/+. Esta diferencia es estadísticamente significativa desde la semana 7 a la semana 13 entre los machos VIP -/- y los VIP +/-; y desde la semana 9 a la semana 11 cuando la comparación se hace entre machos VIP -/- y VIP +/+; es decir, antes del inicio de la enfermedad en el modelo, una vez iniciada la misma, dichas diferencias no son evidentes (Figura 17c). Cabe destacar también que en el grupo de animales SOD1^{G93A} VIP +/+ la caída de peso es más pronunciada que en el caso de los animales SOD1^{G93A} VIP -/-. El grupo de animales heterocigotos para VIP +/- muestra una caída, en cuanto a la evolución de pesos, intermedia entre los otros dos grupos (Figura 17c).

Al analizar la evolución de pesos en los animales no portadores del transgen observamos que la ausencia de VIP (VIP -/-), al igual que en el caso de las hembras, está asociada a un menor peso basal y a una menor ganancia de peso a partir de la semana 8 de edad, manteniéndose dicha diferencia hasta la semana 26, punto en el cual se detuvo la monitorización (Figura 17d). Al

comparar el grupo VIP -/- con el grupo VIP +/- observamos que dicha diferencia es estadísticamente significativa desde la semana 8 a la 26. Cuando la comparación se realiza con el grupo VIP +/+ observamos la misma tendencia pero carente de significancia estadística (Figura 17d).

3.2.2. Evaluación del equilibrio y la coordinación

El análisis de la evolución de pérdida de equilibrio y de coordinación mostró que los machos SOD1^{G93A} VIP +/+ mantuvieron el 100% de rendimiento hasta la semana 14, mientras que los animales SOD1^{G93A} VIP +/- y SOD1^{G93A} VIP -/- mostraron déficits motores desde que se comienza a hacer la prueba de comportamiento; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 18b). Cabe destacar que los machos SOD1^{G93A} VIP +/+ y VIP +/- sufrieron una caída dramática en el desempeño de esta prueba a la semana 15, en el caso de los animales SOD1^{G93A} VIP -/- observamos que dicha caída tuvo lugar más tarde, en la semana 17 (Figura 18b).

3.2.3. Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia

Los datos de supervivencia obtenidos nos muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales estudiados, la ausencia de VIP no modifica la supervivencia asociada a los machos SOD1^{G93A} (Figura 19b Gráfica insertada y Tabla 6).

El análisis del momento de inicio de la enfermedad en base al punto en el que el animal alcanza el peso máximo muestra que en ausencia de VIP (VIP -/-) los machos SOD1^{G93A} ven retrasado dicho inicio de forma estadísticamente significativa en comparación con los animales SOD1^{G93A} controles para VIP (93.3±3.5 y 82.7±3.5 días, respectivamente) (p=0.036) (Figura 19b y Tabla 6). Dicha diferencia se hace también evidente y tiene tendencia a la significancia

($p=0.061$) cuando se les compara con el grupo de animales SOD1^{G93A} VIP +/- (84.4±1.9 días) (Figura 19b y Tabla 6).

En términos de duración de la enfermedad, considerando ésta como el tiempo transcurrido entre el momento de inicio en base al peso máximo alcanzado y el punto final artificial, se observó que la ausencia de VIP (VIP -/-) lleva asociada una duración más corta de la misma en comparación a la mostrada por el grupo de animales SOD1^{G93A} VIP +/+. Sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 19c y Tabla 6).

En resumen, al analizar los datos referentes a machos SOD1^{G93A} carentes de VIP observamos que la carencia de dicho neuropéptido no afecta a la supervivencia de los animales. En relación al momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado, los resultados muestran que la carencia completa de VIP hace que se retrase de forma significativa dicho inicio. En este sentido, que dicha ausencia completa de VIP también afecta al tiempo transcurrido entre el momento de inicio de la enfermedad y el punto final artificial, haciendo que la enfermedad avance con mayor velocidad, aunque esta tendencia no es estadísticamente significativa.

3.3. Evolución de la enfermedad en animales SOD1^{G93A} defectivos en VIP: estudio de influencia del sexo de los animales

3.3.1. Monitorización de la evolución de peso

Además de las diferencia por sexo ya explicadas, no se observaron diferencias significativas en cuanto al peso entre hembras y machos carentes de VIP de acuerdo al análisis comparativo realizado.

3.3.2. Tiempos de establecimiento de la enfermedad y supervivencia

En todos los genotipos analizados para VIP, se observó que la supervivencia de las hembras es superior a la de los machos. Sin embargo, esta diferencia sólo es estadísticamente significativa entre las hembras VIP +/- y los machos VIP +/- ($p=0.011$) (Figura 19a/b gráficas insertadas y Tabla 6).

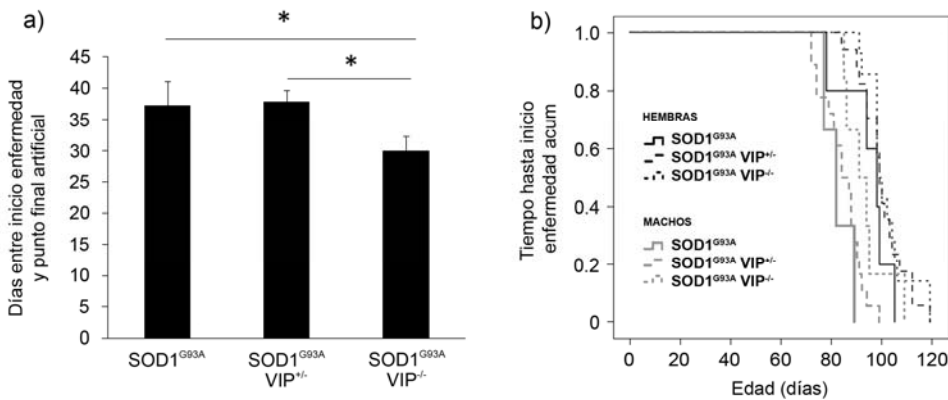


Figura 20. Influencia del sexo del animal en relación al papel que el VIP endógeno presenta en el contexto de la ELA. a) Evaluación del tiempo transcurrido entre el inicio de la enfermedad en base al peso máximo y el punto final artificial agrupando los datos de machos y hembras SOD1^{G93A}. En el estudio estadístico se aplicó la llamada prueba U de Mann Whitney aplicada a dos muestras independientes; (* $p \leq 0.05$). b) Evaluación del momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal.

En cuanto al tiempo transcurrido hasta al inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado, observamos que los tres grupos de hembras SOD1^{G93A} estudiados, VIP^{-/-}, VIP^{+/-} y VIP^{+/+}, se retrasa el inicio de la enfermedad en comparación con los machos SOD1^{G93A} VIP^{+/-} y VIP^{+/+} (Figura 20b). De forma más precisa cabe mencionar que al comparar las hembras SOD1^{G93A} VIP^{+/+} con los machos SOD1^{G93A} VIP^{+/+} y VIP^{+/-} se ve retrasado el inicio de la enfermedad de forma estadísticamente significativa ($p=0.046$ y $p=0.020$, respectivamente). Del mismo modo obtenemos diferencias con significancia estadística al

comparar las hembras SOD1^{G93A} VIP +/- y las VIP -/- con los machos SOD1^{G93A} VIP +/+ y VIP +/- (en ambos casos $p=0.000$ y $p=0.000$, respectivamente). Curiosamente dicha diferencia no se hace evidente en el caso de los machos SOD1^{G93A} VIP -/-, grupo en el cual se ve retrasado dicho inicio, tal y como se especificó anteriormente (Figura 20b).

Cuando analizamos la duración de la enfermedad y comparamos los machos SOD1^{G93A} VIP +/- con las hembras SOD1^{G93A} VIP +/- encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.005$) (Figura 19c y Tabla 6). En el caso de las hembras, aunque como se mencionó anteriormente se retrasaba el inicio de la enfermedad, la duración de la misma se ve reducida, se alcanza con mayor rapidez el punto final artificial en comparación con los machos VIP +/- (34 ± 2.81 vs 41.94 ± 1.54 días) (Figura 19c y Tabla 6).

Cuando se agrupan ambos sexos y se realiza el análisis de forma conjunta, los resultados arrojan claras diferencias estadísticamente significativas. La duración de la enfermedad es menor en los animales SOD1^{G93A} (machos y hembras) carentes de VIP (VIP -/-) que en los animales SOD1^{G93A} controles para VIP ($p=0.026$) y que en los animales SOD1^{G93A} VIP +/- (Figura 20a).

Tabla 6. Resumen de los resultados derivados de los grupos experimentales analizados con el fin de evaluar el papel que el VIP endógeno presenta en el contexto de la ELA, empleando los animales SOD1^{G93A}.

Genotipo de los animales experimentales		Sexo	Número de animales	Media de supervivencia (días)	Tiempo hasta el inicio de la enfermedad en base al peso máximo (días)	Tiempo de duración de la enfermedad (días)
hSOD1	VIP					
+/-	-/-	H	14	128.8±2.7	102.1±2.2	28.9±2.5
		M	6	126.8±4.8	93.3±3.5	33.5±2.5
+/-	+/-	H	17	134.3±2.3	100.3±2.1	34±2.8
		M	19	125.7±1.7	84.4±1.9	41.9±1.5
+/-	+/+	H	5	131.8±4.3	94.8±4.5	37.0±5.2
		M	3	124.0±7.0	82.7±3.5	38.5±3.5

IV. DISCUSIÓN

Péptidos tales como VIP y PACAP han sido dotados con un amplio abanico de funciones inmunomoduladoras a nivel sistémico, entre ellas, la inhibición de la producción de citoquinas y quimioquinas, y la modulación de la proliferación de células T y de ciertas funciones asociadas a macrófagos (fagocitosis y quimiotaxis). La gran capacidad inmunomoduladora asociada a VIP hace que se le otorgue un papel importante como potencial agente terapéutico en ciertas enfermedades neurodegenerativas que llevan consigo asociada una relevante inflamación crónica (Waschek 2013; Tan & Waschek 2011).

Tanto la esclerosis múltiple (EM) como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) son enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por una importante neuroinflamación. A pesar de que la ELA no presenta un componente autoinmunitario claro, la fisiopatología de esta enfermedad presenta ciertas similitudes con la EM. Es por ello por lo que los resultados derivados de estudios sobre el modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE) para el estudio de la EM, pudieran resultar potencialmente útiles en el contexto de la ELA (Tan & Waschek 2011; Gonzalez-Rey et al. 2006; Fernandez-Martin et al. 2006).

VIP ha demostrado ser un buen candidato en la supresión de los síntomas del modelo de EAE, tanto a nivel periférico como a nivel central, gracias a sus propiedades neuroprotectoras e inmunomoduladoras (Tan & Waschek 2011). En la periferia, VIP promueve la generación de células Th2 y células T reguladoras, y reduce la diferenciación de células T en células Th1 y Th17. Se sabe que estas últimas son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y que su reactivación en el sistema nervioso central (SNC) hace que proliferen y secreten citoquinas proinflamatorias, promoviendo así el reclutamiento de otras células inmunitarias e induciendo el proceso inflamatorio. Por otra parte,

en el SNC, VIP modula la reactivación y proliferación de las células Th1 y Th17. Todo ello induciría un estado neuroprotector frente a la degeneración asociada (Tan & Waschek 2011). En este sentido, existen estudios que evalúan el potencial terapéutico de VIP en los modelos crónico y recurrente de EAE, (Gonzalez-Rey et al. 2006). En el modelo de EAE crónico se observa que la administración profiláctica de VIP limita en gran medida el desarrollo de EAE, y reduce la incidencia y la severidad de la enfermedad. Un bajo porcentaje de los animales tratados con VIP desarrollaron síntomas moderados de EAE pero se consiguieron recuperar 20-30 días después del inicio de los síntomas. Cuando en este modelo se inicia la administración de VIP en fase sintomática, se observa que el tratamiento con el neuropéptido consigue reducir los síntomas asociados. Por otra parte, al evaluar el potencial terapéutico de VIP en el modelo de EAE recurrente, se comprueba que dicho neuropéptido es también capaz de reducir la severidad de la enfermedad y mejorar el estado del animal (Gonzalez-Rey et al. 2006). En el año 2006, Fernández-Martin y colaboradores, demostraron también que VIP mejoraba el proceso patológico asociado a la EAE modulando la respuesta inmunitaria, reduciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias e induciendo la expresión de citoquinas antiinflamatorias (Fernandez-Martin et al. 2006). Se sabe que el tratamiento con VIP en animales modelo de EAE, reduce la desmielinización, la pérdida de oligodendrocitos y el daño axonal asociado. Cabe mencionar que dicho neuropéptido también presenta efectos a nivel de la médula espinal, reduciendo los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-18 e IL-12) y de otros mediadores inflamatorios (Gonzalez-Rey et al. 2006).

Por su parte, Goursaud y colaboradores, publicaron recientemente un estudio llevado a cabo en un modelo de ratas transgénicas SOD1^{G93A} para el estudio de ELA (Goursaud et al. 2015). Observaron que al tratarlas de forma profiláctica,

durante 80 días antes del inicio de los síntomas, con un derivado de VIP, SNV (del inglés *stearyl-norleucine-VIP*), se vio retrasado el inicio de la enfermedad hasta 3 semanas, y se prolongó la supervivencia de los animales hasta 2 meses aproximadamente. Es importante mencionar que la supervivencia de los animales empleados como control fue de 171.9 ± 4.8 días, frente a 223.5 ± 14.1 días en el grupo de animales tratados con SNV. Las inyecciones fueron realizadas en días alternos por vía intraperitoneal, $10 \mu\text{g}$ SNV/animal (Goursaud et al. 2015).

La muerte de neuronas motoras característica de la ELA hace que sea interesante explorar el papel que NAP desempeña en el contexto de esta enfermedad, ya que se sabe que actúa como un potente neuroprotector (Bassan et al. 1999). El estudio del potencial terapéutico que el octapéptido NAP tiene en el contexto de la ELA ha sido también abordado por Gozes y colaboradores (Jouroukhin et al. 2012; Jouroukhin et al. 2013). Sus resultados muestran que el tratamiento diario iniciado en fase sintomática con $10 \mu\text{g}$ de NAP inyectado vía subcutánea, consigue prolongar de forma significativa la supervivencia de las hembras SOD1^{G93A}, no así en el caso de los machos (Jouroukhin et al. 2013). Estos autores exponen que las hembras transgénicas tratadas con NAP tienen una supervivencia media de 143.5 ± 4.2 días, mientras que las que no han recibido dicho tratamiento sobreviven una media de 136.6 ± 1.1 días (Jouroukhin et al. 2013).

El análisis de supervivencia de los animales SOD1^{G93A} muestra que el tratamiento VIP y NAP, tanto sintomático como profiláctico, no afecta a la vida de los animales, la supervivencia no se ve alterada. Sin embargo, nuestros resultados muestran que el tratamiento iniciado en fase pre-sintomática con VIP y NAP, hace que se adelante el momento de inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal. Sin embargo, dicho tratamiento

profiláctico consigue reducir la agresividad de progresión de la misma, los animales son capaces de vivir durante un periodo de tiempo mayor con los síntomas asociados al proceso patológico que tiene lugar en el modelo. Curiosamente, se observa que cuando los animales tienen 20 semanas de edad, el grupo que ha sido tratado con VIP presenta una menor pérdida del equilibrio y de la coordinación.

Por otra parte, cuando el comienzo del tratamiento con VIP y NAP tiene lugar una vez iniciados los síntomas, observamos que también se ve adelantado el inicio de la enfermedad en base al peso máximo alcanzado por el animal en el modelo, pero no de forma tan acusada como en el caso del tratamiento profiláctico. Cuando el tratamiento comienza en fase profiláctica, la caída de peso de los animales tratados tiene lugar antes que en el caso de los animales en los que el tratamiento comienza una vez iniciados los síntomas motores. Ambas aproximaciones terapéuticas adelantan dicha pérdida de peso en comparación con los animales no tratados con VIP y NAP.

Al comparar los resultados referentes al tiempo transcurrido entre el inicio de la enfermedad y el punto final artificial, comprobamos que cuando el inicio del tratamiento tiene lugar una vez iniciados los síntomas, el tratamiento con NAP no consigue reducir de forma tan significativa la agresividad de progresión de la enfermedad. Sin embargo, cuando el comienzo de la terapia con VIP tiene lugar una vez iniciados los síntomas, dicho neuropéptido consigue ralentizar de forma más acusada la velocidad de progresión del proceso patológico en el modelo. Nuestros resultados también muestran que el inicio del tratamiento en fase sintomática hace que los animales tratados presenten mayor pérdida de peso a partir de la semana 19 en comparación a los animales transgénicos empleados como controles de progresión de la enfermedad en el modelo. Estos resultados pondrían de manifiesto la importancia del momento de inicio del

tratamiento en la modulación de la progresión de la enfermedad, muy posiblemente por las diferentes poblaciones celulares y procesos moleculares implicados en cada fase de la misma.

Los resultados obtenidos en relación al tratamiento con NAP muestran que el tratamiento iniciado en fase sintomática no afecta a la supervivencia de los animales de forma significativa, pero si adelanta el inicio de los síntomas característicos y ralentiza la velocidad de progresión de la enfermedad en el modelo. Los autores anteriormente mencionados, Gozes y colaboradores, no muestran datos sobre el momento de inicio de la enfermedad y el tiempo transcurrido hasta el punto final artificial (Jouroukhin et al. 2013). En este contexto es importante mencionar que nosotros, a diferencia de los autores anteriormente citados, realizamos inyecciones en días alternos, cada 48h, y la vía de administración era intraperitoneal. Otro dato importante a tener en cuenta es el modelo animal empleado, ya que ellos usan en modelo SOD1^{G93A} congénico, y nosotros realizamos nuestro estudio sobre el modelo SOD1^{G93A} con fondo híbrido, el cual implica mayor variabilidad en el modelo, reflejando así de una forma más aproximada la heterogeneidad existente entre los pacientes con ELA.

Gozes y colaboradores realizaron también un estudio en el que trataron a los animales SOD1^{G93A} con un compuesto D-aminoácido análogo a NAP, D-NAP (Jouroukhin et al. 2012). Observaron que cuando el tratamiento se comenzaba en fase sintomática no se veía afectada la supervivencia de los animales. Sin embargo, cuando se iniciaba antes el tratamiento, desde el día 2 de edad de los animales, se incrementaba de forma significativa la supervivencia de los animales tratados con D-NAP. Como en el estudio anteriormente descrito, siguieron una pauta de administración diaria, con inyecciones subcutáneas de 8 µg de D-NAP (Jouroukhin et al. 2012). Adicionalmente, existen estudios

publicados que demuestran que en un modelo para el estudio del síndrome del alcoholismo fetal, el tratamiento con NAP y SAL, péptido derivado del ADNP, consiguen reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias (Roberson et al. 2012).

Cabe destacar que el modelo SOD1^{G93A} es un modelo muy agresivo; sin embargo, a pesar de ello observamos que el tratamiento con VIP y NAP modifican la historia natural de la enfermedad, lo cual puede resultar interesante como punto de partida para desarrollar estrategias basadas en neuropéptidos.

Una de las limitaciones principales del tratamiento con VIP es la corta vida media de este neuropéptido en circulación. En este sentido, el empleo de células mesenquimales que sobreexpresen VIP supondría una estrategia que permitiría prolongar la exposición al péptido, y con ello, optimizar la potencial modulación de la respuesta inmunitaria. Nuestros estudios de biodistribución apoyarían esta hipótesis, ya que comprobamos que las células inyectadas son detectadas hasta 84 horas después de la inyección intraperitoneal de las mismas. Curiosamente, observamos que algo más del 10% (13.33%) de los animales inyectados con células mesenquimales que sobreexpresaban VIP, conservaron su función motora, en términos de equilibrio y coordinación, hasta la semana 28, unas 7 semanas más que el grupo de animales SOD1^{G93A} no tratado. Cabe mencionar que estos animales no sufrieron la pérdida de peso característica del modelo, sus pesos oscilaron entre 85-100% respecto al peso inicial hasta el punto final artificial en el que el animal tuvo que ser sacrificado por cumplir otro de los criterios empleados para el sacrificio ético del animal. La supervivencia de estos animales fue también significativamente superior a la observada en los animales SOD1^{G93A} sin tratar. Estos resultados también ponen de manifiesto que, como pasa en humanos, pueden existir animales más

respondedores al tratamiento con las células mesenquimales que otros, lo cual sugiere que puede merecer la pena seguir explorando el efecto de las mismas.

Es importante resaltar, que una de las herramientas más útiles en el estudio del papel de VIP, PACAP y sus receptores, ha sido el empleo de animales *knock out* (KO). Esta aproximación permite conocer el papel que desempeñan a nivel fisiológico y fisiopatológico, así como su potencial farmacológico, ya que actualmente no existen agonistas/antagonistas de alta afinidad y especificidad a estos receptores que permitan llevar a cabo estos estudios. En este sentido, en el año 2013, Ringer y colaboradores, publicaron un estudio en el que demostraban que ratones SOD1^{G93A} carentes de PACAP (*knock out* para PACAP) veían extendida su supervivencia de forma significativa en comparación con los animales SOD1^{G93A} empleados como control (Ringer et al. 2013). Demostraron también el papel dual asociado a PACAP en el contexto de la ELA. Observan que presenta un efecto neuroprotector sobre neuronas visceromotoras y una acción opuesta sobre la función microglial en ratones SOD1^{G93A} (Ringer et al. 2013). Se observa que existe activación de la microglía en el tallo cerebral y en la médula espinal, en los animales SOD1^{G93A} a los 120 días postnatal, estado avanzado de la enfermedad, no así en los animales *knock out* para PACAP. Estas diferencias no se hacen patentes en fase pre-sintomática. Este hecho pone de manifiesto la complejidad del papel que PACAP juega en el contexto de esta enfermedad neurodegenerativa (Ringer et al. 2013).

Al explorar el papel de VIP endógeno en el contexto de la ELA, nuestros resultados ponen de manifiesto que en el caso de las hembras SOD1^{G93A} la carencia de VIP no afecta a la pérdida de peso característica del modelo. Sin embargo, en el caso de los machos SOD1^{G93A}, la ausencia completa de VIP (VIP *knock out*) está asociada a un menor peso corporal, los machos transgénicos presentan pesos iniciales menores, este hecho hace que la curva de pérdida de

peso sea menos acentuada que en el caso de los animales que sí expresan VIP. La ausencia de VIP parece reducir el potencial de crecimiento de los animales. Recientemente se ha descrito como el neuropéptido VIP está involucrado en la regulación del apetito/saciedad, el peso corporal, la ingesta de alimentos, la regulación de algunas hormonas relacionadas con el metabolismo y la masa corporal (Vu et al. 2015). Evidencias experimentales muestran que los animales carentes de VIP presentan pesos corporales significativamente menores a los animales empleados como control (Lim et al. 2008; Vu et al. 2015). Nuestros resultados coincidirían con esta observación, ya que observamos que la ausencia de VIP se hace patente de forma más significativa en la evolución de los pesos corporales de los animales no transgénicos. Quizá debido a que los animales transgénicos se caracterizan por un peso basal más bajo que los animales no portadores del transgen.

En relación al papel del VIP endógeno en el transcurso de la enfermedad en el modelo, observamos que dicho neuropéptido afecta al momento de inicio de los síntomas asociados al proceso patológico. La ausencia parcial y total de VIP endógeno retrasa dicho inicio y sin embargo, hace que la enfermedad avance más rápido que en el caso de los animales controles para VIP, es decir, el tiempo transcurrido entre el inicio de la enfermedad y el punto final artificial es menor. Estos datos serían consistentes en cierta medida con los obtenidos al tratar a los animales con VIP exógeno, ya que dicho tratamiento adelanta el inicio de la enfermedad en el animal y reduce la velocidad de avance de la misma, es decir, el efecto opuesto al visto en el modelo *knock out* para VIP. Ambas estrategias se complementarían hasta cierto punto, pondrían de manifiesto el valor del VIP desde el punto de vista fisiológico en la evolución de la enfermedad.

Nuestros resultados son evidencia de la complejidad del papel que este neuropéptido juega en el contexto de la ELA. Curiosamente, este hecho no sólo se hace patente en el caso de la ELA, estudios llevados a cabo en el modelo de EAE para EM, ponen de manifiesto también que VIP desempeña un papel complejo en el desarrollo de esta enfermedad neuroinflamatoria y autoinmune.

A pesar del efecto beneficioso observado al tratar a los animales del modelo de EAE con VIP (Gonzalez-Rey et al. 2006), Abad y colaboradores, demostraron que animales carentes de VIP endógeno (*VIP knock out*) eran, en un alto porcentaje, resistentes al desarrollo de EAE. Observando también que en los casos en los que se desarrollaba el proceso patológico asociado a este modelo, se retrasaba el inicio de los síntomas y las manifestaciones clínicas eran menores o ausentes. Cabe mencionar que estos autores comprobaron también que la administración de VIP, 10 nmol/día por vía intraperitoneal durante 2 semanas finalizando el tratamiento un día antes de inmunización con MOG para el desarrollo de EAE, revierte el fenotipo *VIP knock out* y se restaura el desarrollo de EAE (Abad et al. 2010).

Estos resultados coinciden con los publicados por estos autores en un modelo animal de endotoxemia y en un modelo para el estudio de la enfermedad de Crohn (Abad et al. 2012; Abad et al. 2015). Los animales *VIP knock out* exhibían resistencia frente al desarrollo de endotoxemia inducida por el tratamiento con lipopolisacárido (LPS) (Abad et al. 2012). Estos autores también demostraron que los animales *VIP knock out* presentaban resistencia frente al desarrollo del proceso patológico que tiene lugar en el modelo de estudio de la enfermedad de Crohn, en comparación con los animales empleados como control (Abad et al. 2015). Todos estos datos sustentan el papel que el VIP endógeno presenta en modelos de enfermedades con importante componente inflamatorio.

Evidencia adicional del papel de VIP endógeno en enfermedades neurodegenerativas proviene de los estudios de Werdelin y colaboradores, quienes observaron una disminución de los niveles de VIP en LCR de pacientes con ELA.. Esto podría estar relacionado con cambios a nivel de la liberación de VIP desde el SNC o a nivel de la degradación de VIP. Es bien sabido que la ELA lleva asociada muerte de neuronas motoras, por lo que la primera hipótesis es más probable. En pacientes de EM también se han observado niveles reducidos de VIP (Werdelin et al. 1989).

En relación a todo lo anteriormente descrito es importante recalcar que la ausencia de ciertos genes tanto durante el desarrollo embrionario como durante el desarrollo posnatal, tal y como ocurre en los animales *knock out* descritos, condiciona el desarrollo posnatal del animal, pudiendo afectar a la composición y funcionalidad de diferentes poblaciones celulares y procesos moleculares en la fisiopatología de la ELA. Es por ello por lo que en cierta medida podrían explicarse los efectos diferenciales observados al estudiar el efecto endógeno de VIP/PACAP o sus receptores, y al evaluar el efecto derivado del tratamiento exógeno con dicho neuropéptido.

Los resultados de nuestro trabajo indican que VIP y NAP parecen afectar al transcurso de la ELA. Sin embargo, se necesitan estudios más amplios para poder caracterizar el mecanismo adscrito a estos péptidos en la patogénesis de esta enfermedad.

V. CONCLUSIONES

- ◆ El tratamiento con VIP y NAP tanto profiláctico como terapéutico adelanta el inicio de la enfermedad. Sin embargo, reduce la velocidad de avance del proceso patológico una vez iniciado.
- ◆ El 13.33% de los animales tratados con células mesenquimales que sobreexpresaban VIP conservaron su desempeño motor, no presentaron la típica pérdida de peso asociada a la progresión de la enfermedad en los animales, y vieron prolongada de forma significativa su supervivencia respecto a los animales no tratados.
- ◆ El VIP endógeno afecta al transcurso de la enfermedad en el modelo, en relación al momento de inicio de los síntomas y tiempo transcurrido desde dicho inicio hasta el punto final artificial. Los animales nulos para VIP ven retrasado el inicio de los síntomas, pero la enfermedad evoluciona de forma más agresiva que en los animales controles para VIP. Lo que sugiere un papel del VIP en el desarrollo de esta enfermedad.

Capítulo 2. RESPUESTA INMUNITARIA PERIFÉRICA EN ELA

I. RESUMEN Y FUNDAMENTO TEÓRICO

Actualmente se sabe que el sistema nervioso central (SNC) no es una zona inmunológicamente privilegiada. El tejido nervioso es blanco de respuestas inmunitarias mediadas por diferentes mecanismos (Lehnardt 2009; Hickey 1999; Carson et al. 2006; Louveau et al. 2015). De hecho, cuenta con macrófagos residentes, las células microgliales y los astrocitos entre ellos (Lehnardt 2009; Hickey 1999; Carson et al. 2006; Perry 2004). Se sabe también que la respuesta inflamatoria es mediada en gran parte por los receptores de tipo Toll, que están presentes tanto a nivel periférico como a nivel central, y que dicha respuesta inflamatoria juega un papel importante en los procesos neurodegenerativos, en la enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre ellos (Xiang et al. 2015; Evans et al. 2013; Liu & Kielian 2009; Lehnardt 2009; Salmina et al. 2015; Drouin-Ouellet & Cicchetti 2012; Perry 2004; Pocock & Liddle 2001; Bsibsi et al. 2002). Los TLRs son fundamentales en el control inicial de la replicación de agentes patógenos, en el reclutamiento y activación de células del sistema inmunitario adaptativo para su posterior eliminación, y en el reconocimiento de productos derivados del daño tisular (Akira et al. 2006). Existen evidencias de la respuesta mediada por TLRs en microglía y la comunicación bidireccional entre células periféricas infiltradas y células gliales (astro/microglía), y su efecto sobre neuronas (Salmina et al. 2015). En este sentido es interesante explorar la respuesta derivada del estímulo de TLRs en las células inmunitarias periféricas en el contexto de la ELA. Esta respuesta podría llegar a estar relacionada con otras respuestas de carácter inmunitario en el SNC, y la modulación de la misma podría llegar a constituir una potente herramienta para modular el curso de la enfermedad.

La etiología de la ELA es compleja y no se conoce al completo, pero existen autores que apoyan la influencia de factores ambientales como posibles implicados en el desarrollo de la misma (Belbasis et al. 2016). Evidencias experimentales sustentan un posible nexo entre infecciones bacterianas sistémicas y el transcurso de la enfermedad en modelos animales de ELA (Ebert et al. 2010; Nguyen et al. 2004). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que el reclutamiento de linfocitos T CD8 en el SNC asociado a infecciones periféricas por virus puede conllevar a procesos patológicos en el SNC en los animales estudiados (Matullo et al. 2011).

Es importante resaltar que algunos estudios sustentan el hecho de que la activación del sistema inmunitario periférico exacerba la respuesta inflamatoria a nivel central, y que todo ello contribuye al proceso neurodegenerativo (Su & Federoff 2014). El estudio de la naturaleza del proceso inflamatorio crónico asociado al desarrollo de la enfermedad, y de los posibles factores de riesgo que contribuyen al mismo y que alteran la homeostasis inmunitaria a nivel central y periférico, permitirá un mayor conocimiento sobre el proceso fisiopatológico que tiene lugar en la ELA. En este sentido, existen estudios que apoyan el papel que la señalización mediada por TLRs y la proteína adaptadora MyD88 tendrían en el contexto de la ELA. En 2004, Nguyen y colaboradores, demostraron que la inyección intraperitoneal repetida de LPS en animales modelo de ELA exacerbaba el proceso neurodegenerativo del modelo murino de ELA (Nguyen et al. 2004). Los resultados muestran que el tratamiento con LPS induce los niveles de expresión de TLR-2 y de citoquinas proinflamatorias en las regiones afectadas de la médula espinal. Además, este hecho se correlaciona con la severidad del proceso fisiopatológico en la ELA (Nguyen et al. 2004). Años más tarde, Kang y colaboradores, demostraban que la respuesta

inflamatoria inducida por la proteína SOD1 mutada era mediada por vías de señalización asociadas a TLRs/MyD88 (Kang & Rivest 2007; Zhao et al. 2010).

Uno de nuestros objetivos era evaluar si existía un perfil hipo respondedor o hiper respondedor asociado a la respuesta frente a ligandos específicos de TLRs en el contexto de la ELA a nivel periférico, es decir, si a un mismo estímulo mediado por TLRs se observaba una respuesta diferencial durante el proceso patológico asociado a la ELA. Para ello llevamos a cabo un estudio sobre células mononucleares de sangre periférica (del inglés PBMC) de pacientes con ELA en diferentes fases de evolución de la enfermedad y sobre esplenocitos del modelo animal SOD1^{G93A}: ambos tipos celulares se consideran una población heterogénea de células inmunocompetentes válida para el estudio de la respuesta inmunitaria periférica. De este modo evaluamos si existía alteración de dicha respuesta que pudiera identificar dianas de intervención. El perfil de respuesta ligada a TLRs lo obtuvimos en base a la cuantificación de los niveles de IL-6, IFN- γ e IL-10, tres citoquinas asociadas al proceso patogénico que tiene lugar durante la ELA. Evidencias experimentales publicadas demuestran que determinadas citoquinas, IL-6 e IFN- γ entre ellas, se encuentran aumentadas tanto en los tejidos afectados como en sangre periférica de pacientes con ELA (Houi et al. 2002; Itzecka et al. 2002). Por otra parte, Zhang y colaboradores presentaron un estudio en el que mostraban niveles reducidos de expresión de la interleuquina inmunorreguladora IL-10 en sangre periférica de pacientes con ELA (Zhang et al. 2009).

Nuestra aproximación nos permitiría también la validación del modelo animal SOD1^{G93A}, explorando así el grado de extrapolación de los resultados derivados de dicho modelo a pacientes con ELA. Realizamos nuestra aproximación a nivel del sistema inmunitario periférico, ya que se sabe que se encuentra alterado en muchas de las enfermedades neurodegenerativas del SNC, y porque permite

una intervención sencilla en la búsqueda de biomarcadores y de potenciales dianas terapéuticas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ligandos de TLRs

El lipopolisacárido de *Escherichia coli* de serotipo 0127:B (LPS) fue adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU). El resto de ligandos de TLR se adquirieron en InvivoGen (San Diego, EEUU). Los liofilizados se reconstituyeron siguiendo las indicaciones del fabricante. Estos ligandos fueron: Oligodeoxynucleotido con dominios que contienen motivos CpG (citosina-fosfato-guanina) no metilados tipo B ODN 1688 (CpG), ácido poliiinosínico-policitidílico de bajo peso molecular (poly (I:C-LMW) (Poly I:C), ácido lipoteicoico de *Bacillus subtilis* (LTA), lipoproteína bacteriana sintética Pam3Csk₄ (Pam3), lipoproteína sintética derivada de *Mycoplasma* (FSL-1), peptidoglicano de *Bacillus subtilis* (PGN) e Imiquimod (Imiq) (Tabla 7).

Tabla 7. Ligandos específicos de TLRs empleados en nuestro estudio y TLRs asociados a cada uno de ellos.

Ligandos TLR de la superficie celular		
Ligando TLR		TLR asociado
LPS	Lipopolisacárido	TLR-4
LTA	Ácido lipoteicoico	TLR-1/2 y 2/6
FSL-1	Lipoproteína sintética derivada de <i>Mycoplasma</i>	TLR-2/6
PGN	Peptidoglicano	TLR-2
Pam3	Lipoproteína bacteriana sintética Pam3Csk ₄	TLR-1/2

Continúa la tabla en la siguiente página.

Continuación Tabla 7. Ligandos específicos de TLRs empleados en nuestro estudio y TLRs asociados a cada uno de ellos.

Ligandos TLR de compartimentos endocíticos		
Ligando TLR		TLR asociado
CpG	Oligodeoxynucleótido con dominios que contienen motivos CpG no metilados	TLR-9
Poly I:C	Ácido poliinosínico-policitidílico	TLR-3
Imiq	Imiquimod	TLR-7

2. Origen de las muestras: Pacientes con ELA y modelo SOD1^{G93A}

Los pacientes diagnosticados con ELA se encontraban en diferentes fases de progresión de la enfermedad en base al “Criterio del Escorial”. Fueron un total de ocho las muestras de pacientes empleadas en nuestro estudio; tres de ellos se encontraban en una fase inicial de la enfermedad (ELA inicial), y los cinco restantes presentaban un estado más avanzado de la enfermedad (ELA definida) (Tabla 8). Contamos también con un grupo de seis muestras procedentes de individuos sin patología conocida que fueron empleadas como referencia para el análisis de los datos (Tabla 8).

Tabla 8. Muestras humanas incluidas en nuestro estudio: número de individuos según el estado fisiopatológico que presentaban y edad media de cada grupo estudiado.

Individuos estudiados	Estado fisiopatológico	Edad media ± S.E.M. (años)	Sexo (mujer/hombre)
N=6	Sin patología conocida	58.67 ± 8.19	5/1
N=3	ELA inicial	62.33 ± 8.97	1/2
N=5	ELA definida	48.00 ± 8.88	4/1

Los animales utilizados en este estudio fueron los ratones B6SJL-Tg(SOD1^{G93A})1Gur/J, cuyas características se encuentran explicadas en el capítulo 1 (páginas 95 - 100). El manejo de la colonia, así como el genotipado de los animales, se encuentran también explicados en dicho apartado. Se emplearon también animales no transgénicos (*wild-type*) de las mismas camadas, como controles en nuestro estudio. Se realizó el estudio con hembras SOD1^{G93A} a diferentes edades: 8 semanas, como fase pre-sintomática; 12 semanas, como inicio de los síntomas; y 16 semanas, como fase avanzada de la enfermedad. Se emplearon hembras de la misma colonia no portadoras del transgen (*wild-type*) como controles en cada edad estudiada. Fueron 5 los animales usados en cada grupo experimental (n=5).

3. Cultivos celulares: obtención de PBMC humanos y de esplenocitos de ratón

Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes con ELA y de los individuos sin patología conocida mediante punción intravenosa. La sangre se extrajo y se recolectó en tubos Vacutainer® CPT™ *Cell Preparation Tube* (BD, Bioscience, San Diego, CA, EEUU) con heparina sódica. Los PBMC fueron aislados siguiendo las indicaciones del fabricante, centrifugando los tubos a temperatura ambiente durante 20 minutos a una velocidad de 1500×g. Seguidamente se procedió al recuento celular empleando un hemocitómetro y se resuspendieron las células en medio completo RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino inactivado (iFBS) adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU). Las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos, 10⁶ células/pocillo alcanzando un volumen final de 1000 µL/pocillo.

Los ratones fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal de la respectiva dosis de anestesia (Xilacina:Ketamina) premortem, en función del peso del ratón, y posterior dislocación cervical. Tras la disección del animal se

extrajo el bazo. Empleando una jeringa de 10mL y una aguja de 25G x 5/8", 0.5x16 mm, se hicieron pasar a través del bazo 10mL de RPMI-1640 completo suplementado al 1% con aminoácidos no esenciales. Los esplenocitos extraídos se recogieron en una placa de Petri y se transfirieron a un tubo de 15 mL para proceder a la lisis por choque osmótico de los eritrocitos, empleando Red Blood Cell Lysing Buffer® adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU), 1mL buffer de lisis/bazo y manteniendo los tubos en agitación suave durante 5 minutos. A continuación, empleando medio RPMI-1640 completo suplementado al 1% con aminoácidos no esenciales, se realizaron dos lavados (con 10mL de medio, centrifugando a 500xg durante 5 min) y se procedió al recuento celular en hemocitómetro. Usando placas de 24 pocillos se sembraron los esplenocitos aislados (10⁶ células/pocillo), alcanzando un volumen final de 1000 µL/pocillo en RPMI-1640 completo suplementado al 10% con iFBS.

4. Tratamiento con ligandos específicos de TLRs

Tanto los PBMC humanos como los esplenocitos aislados de ratón fueron tratados con los ligandos de TLR específicos, e incubados durante 24h a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂. El tratamiento realizado en el caso de los PBMC humanos incluyó: LPS: 1 µg/mL, CpG: 1 µg/mL y Pam3: 300 ng/mL. En el caso de los esplenocitos, el tratamiento fue: LPS: 1 µg/mL, CpG: 1 µg/mL, Poly I:C: 50 µg/mL, LTA: 10 µg/mL, Pam3C: 300 ng/mL FSL-1: 1 µg/mL PGN: 10 µg/mL, y Imiq: 1 µg/mL.

5. Análisis de citoquinas en sobrenadante

Se recogieron los sobrenadantes tras finalizar las 24h de tratamiento y se centrifugaron a 500g durante 5 min a 20°C, separando de este modo las células (PBMC o esplenocitos, respectivamente) en suspensión del sobrenadante, necesario para llevar a cabo la medición de citoquinas. Las muestras fueron

guardadas a -80°C hasta ser analizadas. Los niveles de IL-6, IL-10 e IFN- γ se determinaron por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), siguiendo las indicaciones del fabricante (*OptEIA Mouse IL-6, IL-10 e IFN- γ* , BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

6. Extracción de ARN y retrotranscripción

Se extrajo el ARN tanto de PBMC como de esplenocitos empleando el reactivo Easy BlueTM Total RNA Extraction Kit[®] (iNtRON Biotechnology Kyungki-Do, Corea), y siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación se retrotranscribió 1 μg del total de ARN aislado, usando el llamado Quantitect Reverse Transcription Kit[®] (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. El cDNA obtenido fue amplificado (60ng de cada muestra), empleando el reactivo SensiFAST[™] SYBR Lo-ROX Kit[®] (Bioline, Londres, Reino Unido) y llevando a cabo la reacción en el termociclador *ABI Prism 7500 Real Time PCR System*.

7. Determinación de los niveles de expresión de genes *TLRs* y *MyD88* en animales *SOD1^{G93A}* y en PBMC humanos

En el caso de los esplenocitos, se analizaron los niveles de expresión de los genes *Tlr2*, *Tlr3*, *TLR4* y *Myd88*, y de hipoxantina fosforribosiltransferasa (*Hprt*), empleado como control interno de amplificación, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). El análisis se llevó a cabo en tres puntos de progresión de la enfermedad en el modelo *SOD1^{G93A}*: pre-sintomáticos (8 semanas de edad), sintomáticos (12 semanas de edad) y estado avanzado (16 semanas de edad). Se analizaron de forma paralela animales *wild-type* de las mismas edades, que fueron usados como controles en cada grupo experimental. Los oligonucleótidos fueron diseñados para alinearse en diferentes exones; los correspondientes a *Tlr4* y *Myd88* se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis,

EEUU) y fueron los siguientes: *Tlr4*-sentido: 5'-ACCAGGAAGCTTGAATCCCT-3' (exón 1); *Tlr4*-antisentido: 5'-TCCAGCCACTGAAGTTCTGA-3' (exón 2); *Myd88*-sentido: 5'-AGAGCTGCTGGCCTTGTTAG-3' (exón 1); *Myd88*-antisentido: 5'-TCATCTCCTGCACAACTCG-3' (exón 3). Los oligonucleótidos para *Tlr2* y *Tlr3* se adquirieron en Qiagen (Hilden, Alemania) y fueron: *Tlr2* (exón 2/3) Cat. No.: QT00129752; *Tlr3* (exón 4/5) Cat. No.: QT00122983. Los oligonucleótidos empleados para *Hprt* fueron: *Hprt*-sentido: 5'-GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC-3' (exón 3); *Hprt*-antisentido: 5'-CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA-3' (exón 7). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, seguidos de 40 ciclos de: 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 35 segundos de alineamiento a 57°C y 33 segundos de extensión a 72°C. Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa: 7500 Real Time PCR Software v2.0.6 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Los valores ΔCt se obtuvieron empleando como control interno de amplificación la expresión del gen *HPRT*. Los valores $\Delta\Delta Ct$ se obtuvieron al restar la media de los valores para ΔCt de las muestras empleadas como control, entendiendo como controles los animales *wild-type* para cada punto de edad estudiado, a cada uno de los valores de ΔCt de las muestras de los animales SOD1^{G93A}, teniendo siempre en cuenta la edad de los animales para hacer los cálculos respecto a los controles no portadores del transgen SOD1^{G93A}.

En el caso de los PBMC humanos, se analizaron los niveles de expresión de los genes *TLR-2*, *TLR-3* y *MyD88*, y de ciclofilina B, control interno de amplificación, mediante qRT-PCR. Este análisis se realizó sobre 3 pacientes en fase de ELA inicial, 5 pacientes en fase de ELA definida y 6 individuos sin patología conocida. Se extrajo el ARN de los PBMC aislados empleando el reactivo Easy BlueTM Total RNA Extraction Kit® (iNtRON Biotechnology Kyungki-Do, Corea), y

siguiendo las indicaciones del fabricante. Seguidamente, se retro-transcribió 1 μg del total de ARN aislado, usando el llamado Quantitect Reverse Transcription Kit[®] (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. El cDNA obtenido fue amplificado, 60ng de cada muestra, empleando el reactivo SensiFAST[™] SYBR Lo-ROX Kit[®] (Bioline, Londres, Reino Unido) y llevando a cabo la reacción en el termociclador *ABI Prism 7500 Real Time PCR System*. Los oligonucleótidos fueron diseñados para alinearse en diferentes exones, los correspondientes a *TLR2*, *TLR3* y *MyD88* se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU) y fueron los siguientes: *TLR2*-sentido: 5'-CTCGGAGTTCTCCCAGTGTT-3' (exón 1), *TLR2*-antisentido: 5'-CAAGACCCACACCATCCACA-3' (exón 3), *TLR3*-sentido: 5'-AGAGTGCCGTCTATTTGCCA-3' (exón 1), *TLR3*-antisentido: 5'-GTGGTGGAGGATGCACACAG-3' (exón 2), *MyD88*-sentido: 5'-GACGACGTGCTGCTGGAG-3' (exón 1), *MyD88*-antisentido: 5'-GAAGGCATCGAAACGCTCAGG-3' (exón 3). Los correspondientes a *ciclofilina B*: *ciclofilina B*-sentido: 5'-CTCCCCGATGAGAACTTCA-3' (exón 4), *ciclofilina B*-antisentido: 5'-TCTTGGTGCTCTCCACCTTC-3' (exón 5). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, seguidos de 40 ciclos de: 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 35 segundos de alineamiento a 61°C y 33 segundos de extensión a 72°C. Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa: 7500 Real Time PCR Software v2.0.6 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Los valores ΔCt se obtuvieron empleando como control interno de amplificación la expresión del gen *ciclofilina B*. Para obtener los valores de $\Delta\Delta\text{Ct}$, a los ΔCt de las muestras de cada paciente, se les restó la media de valores de ΔCt de los individuos empleados como referencia en el estudio.

8. Análisis estadístico

El análisis estadístico empleado fue la prueba U de Mann Whitney, prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Realizado con el programa estadístico IBM SPSS Statistics (v22). (* $p \leq 0.05$)

III. RESULTADOS

1. Niveles basales de citoquinas: pacientes con ELA y modelo SOD1^{G93A}

Los PBMC aislados de pacientes con ELA inicial y ELA definida, y de los individuos sin patología conocida, se cultivaron durante 24h a 37°C. Los sobrenadantes de dichos cultivos fueron recogidos y mediante ELISA se realizó el análisis cuantitativo de tres citoquinas asociadas al proceso patogénico que tiene lugar durante la ELA: IL-6, IL-10 e IFN- γ . Al analizar los resultados para IFN- γ , se detectaron niveles mayores en el grupo de pacientes con ELA inicial en comparación con los niveles detectados en el grupo de pacientes con ELA definida y en el grupo de individuos empleados como control, aunque dicha tendencia carece de significancia estadística (Figura 21a y Tabla 9 ubicada al final del capítulo). En el caso de los niveles de IL-6 e IL-10 secretados por PBMC, se observa que son mayores en el grupo de pacientes con ELA definida, sin embargo esta tendencia no es estadísticamente significativa.

De forma análoga, analizamos el perfil de secreción basal de esplenocitos de ratón SOD1^{G93A}, de 8, 12 y 16 semanas. Para ello se aislaron y cultivaron durante 24h a 37°C. Se emplearon animales no transgénicos (*wt*) como controles para cada uno de los puntos de edad analizados. Los resultados fueron analizados respecto a los niveles observados en animales *wt* de 8 semanas. En concordancia con los resultados observados en PBMC de pacientes con ELA, se observaron mayores niveles basales de IL-6 e IFN- γ en los animales SOD1^{G93A} en comparación con los animales *wt*, a las 16 semanas de edad en el caso de IFN- γ , y a las 12 y a las 16 semanas de edad en el caso de IL-6, aunque dichas diferencias tampoco llegan a ser estadísticamente significativas (Figura 21b y Tabla 10 ubicada al final del capítulo). En el caso del perfil observado para IL-10, cabe mencionar que los animales SOD1^{G93A} en fase avanzada presentan

niveles mayores de dicha interleuquina en comparación con los animales wt de la misma edad, aunque dicha tendencia carece de significancia estadística.

Por otra parte, se observa una tendencia relacionada con el desarrollo postnatal del animal. El análisis de los niveles de IL-6 muestra que a medida que avanza la edad del animal se incrementan los niveles de IL-6, tanto en animales wt como en animales SOD1^{G93A}, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 21b y Tabla 10 ubicada al final del capítulo). Cuando se analiza el perfil de IL-6 en los animales no transgénicos, observamos que al comparar los ratones de 8 semanas con los de 12 semanas (225%±24.15) y los de 16 semanas (320%±39.43), el análisis arroja aumentos estadísticamente significativos, con un valor de $p=0.009$ en ambos casos. Cabe mencionar que al comparar el grupo de animales wt de 12 semanas con el wt de 16 semanas la diferencia observada también presenta significancia estadística, $p=0.047$. Por otra parte, en el caso de los animales SOD1^{G93A}, la media observada en el grupo de animales de 12 semanas, 263%±26.07, y de 16 semanas, 428%±72.64, presenta diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con el grupo de animales SOD1^{G93A} de 8 semanas, con un valor de $p=0.009$ en ambos casos (Figura 21b y Tabla 10 ubicada al final del capítulo).

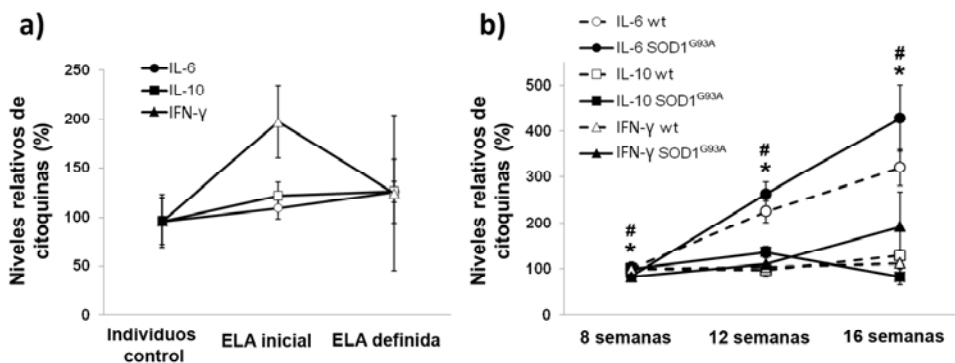


Figura 21. Perfil de secreción basal de citoquinas de PBMC de pacientes con ELA y de esplenocitos de animales SOD1^{G93A}, cuantificado por ELISA. Los valores se representan

como el porcentaje en el que varían los niveles de interleuquina tomando como referencia los individuos sin patología conocida en el caso del estudio realizado en pacientes, o los animales no portadores del transgen de 8 semanas en el estudio realizado sobre el modelo animal, \pm S.E.M. (* $p \leq 0.05$; # $p \leq 0.05$). (*) Diferencias entre los grupos de animales *wt*; (#) Diferencias entre los grupos de animales SOD1^{G93A}. El análisis estadístico empleado para comparar los niveles de las diferentes interleuquinas analizadas fue la prueba U de Mann Whitney.

2. Caracterización de la respuesta mediada por TLRs en pacientes con ELA

Con el objetivo de evaluar si existía un perfil hipo respondedor o hiper respondedor asociado a la respuesta frente a ligandos específicos de TLRs en pacientes con ELA, llevamos a cabo un estudio comparativo de los perfiles de secreción de citoquinas tras el estímulo con ligandos de TLRs *in vitro* sobre PBMC de pacientes en fase inicial (ELA inicial) y en fase avanzada (ELA definida); dichos resultados fueron también comparados con el perfil observado en individuos sin patología conocida (individuos control) (Figura 22 y Tabla 9 ubicada al final del capítulo).

Zhang y colaboradores demostraron en el año 2009, que en plasma de pacientes con ELA esporádica se detectaban niveles aumentados de lipopolisacárido (LPS), y que dichos niveles incrementados se correspondían con el grado de activación de monocitos/macrófagos periféricos, siendo mayor en el caso de los pacientes que presentaban una fase más avanzada de la enfermedad (Zhang et al. 2009). También se observó una correlación negativa entre los niveles de expresión de LPS y los niveles de expresión de IL-10 de monocitos/macrófagos, en sangre periférica de dichos pacientes (Zhang et al. 2009). Años más tarde, estos autores demostraron que al incubar PBMC de pacientes con ELA esporádica durante un periodo corto de tiempo (0 - 24 horas), se observaba una inducción de los niveles de expresión de genes

relacionados con la vía de señalización LPS/TLR-4 (Zhang et al. 2011). En otras palabras, el patrón de expresión de dichos genes en pacientes con ELA esporádica se aproxima al observado tras el estímulo de PBMC de individuos sin patología conocida con LPS, ligando de TLR-4 (Zhang et al. 2011). Estos datos sugieren que tanto la vía de señalización asociada a LPS/TLR-4 como los monocitos/macrófagos activados, juegan un papel importante en el proceso patológico asociado a la ELA esporádica.

En nuestro estudio decidimos explorar la capacidad de respuesta de pacientes con ELA frente al estímulo con LPS y Pam3Csk4, ligandos agonistas de receptores de superficie celular asociados con la respuesta a infecciones bacterianas, TLR-4 y TLR-2/1, respectivamente; así como capacidad de respuesta asociada al ligando CpG, agonista específico del receptor intracelular TLR-9 involucrado en la respuesta frente a infecciones víricas. De este modo exploramos la implicación de la respuesta inmunitaria mediada por TLRs, responsables de la inmunidad innata frente a patógenos, en el contexto de la ELA. Para analizar la capacidad de respuesta de los pacientes con ELA frente al ligando de TLR en cuestión, comparamos los niveles basales de interleuquina secretados por los PBMC con los producidos debido al tratamiento con el ligando, para los distintos grupos de pacientes con ELA e individuos sin patología conocida (individuos control) (Figura 22 y Tabla 9 ubicada al final del capítulo). Los valores representados indican el número de veces (*fold-change*) que varían los niveles de interleuquina consecuencia del tratamiento con los ligandos de TLRs respecto a los niveles basales del cultivo sin tratamiento \pm S.E.M. (Figura 22).

Al analizar los resultados para IFN- γ observamos que los pacientes con ELA definida eran hipo respondedores en comparación con los pacientes con ELA inicial y los individuos control, siendo esta diferencia estadísticamente

significativa en el caso de la respuesta frente a Pam3 y CpG, $p=0.050$ en ambos casos (Figura 22 y Tabla 9 ubicada al final del capítulo). Cuando analizamos los resultados para IL-6 e IL-10, observamos una tendencia similar: la respuesta era menor en el grupo de pacientes con ELA definida. Sin embargo, esta tendencia, no llegaba a ser estadísticamente significativa, excepto en el caso de la respuesta observada tras el estímulo con CpG, ya que, en términos de IL-10, la respuesta del grupo de pacientes con ELA definida era menor a la obtenida en el grupo de pacientes con ELA inicial, $p=0.050$ (Figura 22 y Tabla 9 ubicada al final del capítulo).

Al analizar del mismo modo el perfil de IL-6 observado, se puso de manifiesto que los pacientes con ELA definida respondían en menor medida frente al estímulo con LPS y Pam3, en comparación con la respuesta observada en los pacientes con ELA inicial y en los individuos control. Los incrementos en la respuesta (*fold-change*) observados en el grupo de pacientes con ELA inicial son mayores a los detectados en un estado más avanzado de la enfermedad y en los individuos control (Figura 22 y Tabla 9 ubicada al final del capítulo).

Por último, observamos que en términos de IL-10, los pacientes con ELA definida también son hipo respondedores frente al estímulo con los ligandos en cuestión, en comparación con los grupos de pacientes con ELA inicial y sujetos control. Observándose una respuesta estadísticamente significativa frente al estímulo con los ligandos de TLRs en el caso de los pacientes con ELA inicial e individuos control, respecto a la respuesta de sus PBMC no tratadas ($p \leq 0.05$) (Figura 22 y Tabla 9 ubicada al final del capítulo).

En conjunto, nuestros resultados indican que a pesar de que los niveles basales en términos de secreción de IL-6 e IL-10 son mayores en el grupo de pacientes con ELA definida, los PBMC de dichos pacientes son hipo respondedores frente

al estímulo con los ligandos LPS (TLR-4), Pam3 (TLR-2/1) y CpG (TLR-9), en comparación con la respuesta periférica en el caso de los pacientes con ELA inicial y los individuos control.

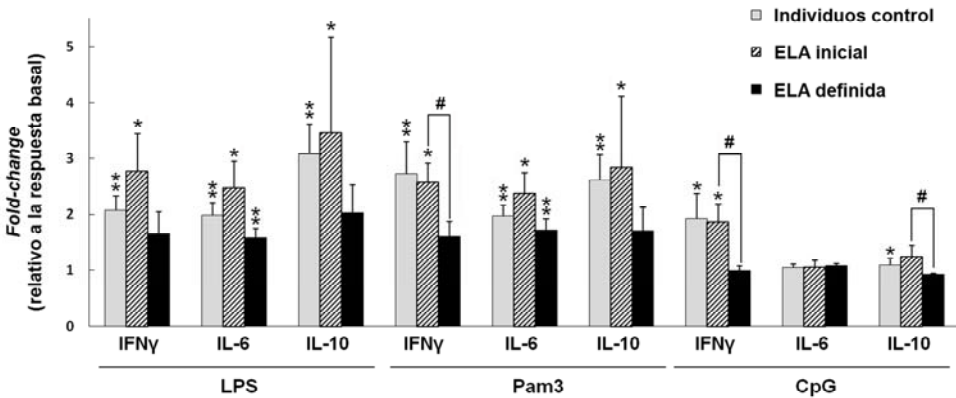


Figura 22. Niveles de citoquinas secretadas en respuesta al tratamiento con ligandos de TLRs sobre PBMC de pacientes con ELA en diferentes fases de progresión de la enfermedad y de individuos sin patología conocida. Los resultados se muestran como la relación entre los valores referentes a la secreción basal de citoquinas y la derivada del estímulo con los ligandos para cada grupo experimental (*fold-change*). Los resultados se exponen como la media \pm S.E.M. (*) Diferencias respecto a los valores basales en términos de secreción de citoquinas (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$). (#) Diferencias entre los diferentes grupos de pacientes incluidos en nuestro estudio (# $p \leq 0.05$). El análisis estadístico empleado para comparar los niveles de las diferentes interleuquinas analizadas fue la prueba U de Mann Whitney para dos muestras independientes.

3. Caracterización de la respuesta a ligandos de TLRs en animales SOD1^{G93A}

Dadas las diferencias observadas en el estudio realizado con los ligandos específicos de TLRs sobre PBMC de pacientes con ELA en diferentes fases de progresión de la enfermedad, decidimos llevar a cabo un estudio similar sobre esplenocitos del modelo animal SOD1^{G93A}, comúnmente empleado en el estudio

de dicha patología. Uno de los objetivos era la validación de los resultados obtenidos al estudiar pacientes con ELA respecto a los derivados al realizar dicha aproximación con el modelo SOD1^{G93A}, con el fin de explorar el nivel de extrapolación de los resultados mostrados por los animales del modelo SOD1^{G93A} respecto a los obtenidos en pacientes con ELA. Al trabajar con animales, se ve facilitado el acceso a las muestras, lo que permite abarcar un mayor número de condiciones experimentales. Por esta razón, decidimos evaluar la respuesta de los esplenocitos de animales SOD1^{G93A} frente a una batería más amplia de ligandos agonistas de TLRs: ligandos análogos a componentes bacterianos reconocidos por TLRs de superficie celular, LPS (TLR-4), Pam3 (TLR-2/1), LTA (TLR-2), PGN (TLR-2) y FSL-1 (TLR-2 and TLR-6) (Figura 23 y Tabla 10 ubicada al final del capítulo); así como ligandos análogos a componentes víricos reconocidos por TLRs de compartimentos endocíticos, Imiq (TLR-7), CpG (TLR-9) y PolyI:C (TLR-3) (Figura 23f-h y Tabla 10 ubicada al final del capítulo).

Los datos fueron analizados como el incremento observado en la respuesta derivada del tratamiento con el ligando en cuestión en relación a la respuesta basal observada (media \pm S.E.M.). Los resultados derivados del tratamiento con agonistas de TLRs de superficie celular (Figura 23a-e y Tabla 10 ubicada al final del capítulo) mostraron que la respuesta frente al tratamiento con el análogo a *Mycoplasma* FSL-1 no era diferente entre los animales *wild-type* y los transgénicos, para ninguna de las citoquinas analizadas ni fase de la enfermedad/edad de los animales estudiados (Figura 23c). Sin embargo, la respuesta frente al agonista de TLR-4 (LPS) era menor en los animales SOD1^{G93A} en comparación con la observada en los animales *wild-type* en términos de niveles de IFN- γ , siendo esta diferencia estadísticamente significativa a las 8 y a las 12 semanas de edad (transgénicos vs. *wild-type*, 14.5 \pm 1.6 vs. 21.4 \pm 2.1 a las

8 semanas, y 13.9 ± 3.75 vs. 41.6 ± 13.8 a las 12 semanas, $p=0.050$ y $p=0.014$, respectivamente) (Figura 23a). Las cifras indican el número de veces (*fold-change*) que varían los niveles de interleuquina consecuencia del tratamiento con los ligandos de TLRs en relación a los niveles basales del cultivo sin tratamiento \pm S.E.M.. El perfil de citoquinas observado consecuencia del tratamiento con Pam3, es similar al anteriormente descrito para el caso de LPS en cuanto a los niveles de IFN- γ , con una diferencia estadísticamente significativa a las 16 semanas (1.4 ± 0.3 vs. 6.5 ± 1.2 , $p=0.009$) (Figura 23e). Estos resultados respaldan el perfil descrito anteriormente en PBMC de pacientes con ELA definida. En este sentido, cabe mencionar que el tratamiento con PGN induce también respuestas inferiores en el caso de los animales SOD1^{G93A} en términos de IL-6 (a las 16 semanas: 17 ± 0.3 vs. 22.2 ± 0.4 , $p=0.021$) e IFN- γ (a las 16 semanas: 0.5 ± 0.03 vs. 1.2 ± 0.3 , $p=0.050$) (Figura 23d). Más aun, el patrón descrito en términos de IFN- γ se mantiene también en la respuesta observada tras el tratamiento con LTA, siendo esta diferencia estadísticamente significativa a las 16 semanas (0.4 ± 0.01 vs. 1.1 ± 0.06 , $p=0.021$); se observa también que en fase pre-sintomática, a las 8 semanas, los animales transgénicos responden en menor medida en términos de IL-10 (1.1 ± 0.05 vs. 1.4 ± 0.05 , $p=0.021$), manteniéndose dicha tendencia a las 12 semanas de edad del animal (Figura 23b).

Al analizar los resultados derivados del estudio realizado con ligandos de receptores de compartimentos endocíticos (Figura 23f-h), observamos una respuesta reducida en los animales transgénicos consecuencia del tratamiento con CpG, a las 12 y a las 16 semanas, en términos de IFN- γ (a las 12 semanas: 0.6 ± 0.1 vs. 1.5 ± 0.1 , $p=0.021$, y a las 16 semanas: 0.6 ± 0.1 vs. 1.5 ± 0.2 , $p=0.028$) e IL-6 (a las 12 semanas: 82 ± 7 vs. 125 ± 17 , $p=0.047$, y a las 16 semanas: 63 ± 2 vs. 93 ± 9 , $p=0.009$) (Figura 23f). De nuevo, estos resultados respaldan los obtenidos

en el estudio realizado sobre PBMC de pacientes con ELA. Por otra parte, la respuesta derivada del tratamiento con Imiq no arrojó demasiadas diferencias entre los animales SOD1^{G93A} y los *wild-type*, exceptuando la diferencia en el mismo sentido, observada a las 16 semanas en términos de IFN- γ (0.33 ± 0.03 vs. 0.86 ± 0.14 , $p=0.021$) (Figura 23g).

Curiosamente, a diferencia de lo observado con los ligandos anteriormente descritos, los resultados obtenidos mostraban que la respuesta derivada del tratamiento con el ligando Poly I:C (TLR-3) provocaba una mayor respuesta en los animales transgénicos que en los animales *wild-type*, en términos de IFN- γ a las 8 semanas de edad (1.5 ± 0.1 vs. 0.7 ± 0.1 , $p=0.014$), y de IL-10 (a las 8 semanas: 2.3 ± 0.5 vs. 0.9 ± 0.05 , $p=0.047$; y a las 16 semanas: 1.6 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.1 , $p=0.021$) (Figura 23h). Cabe mencionar, que aun no siendo estadísticamente significativas las diferencias observadas, a las 8 semanas de edad, fase pre-sintomática del modelo, la respuesta de los animales transgénicos es también mayor a la obtenida en los animales *wild-type*, en términos de secreción de IL-6, tras el tratamiento con FSL-1, Pam3, CpG, Imiq y Poly I:C.

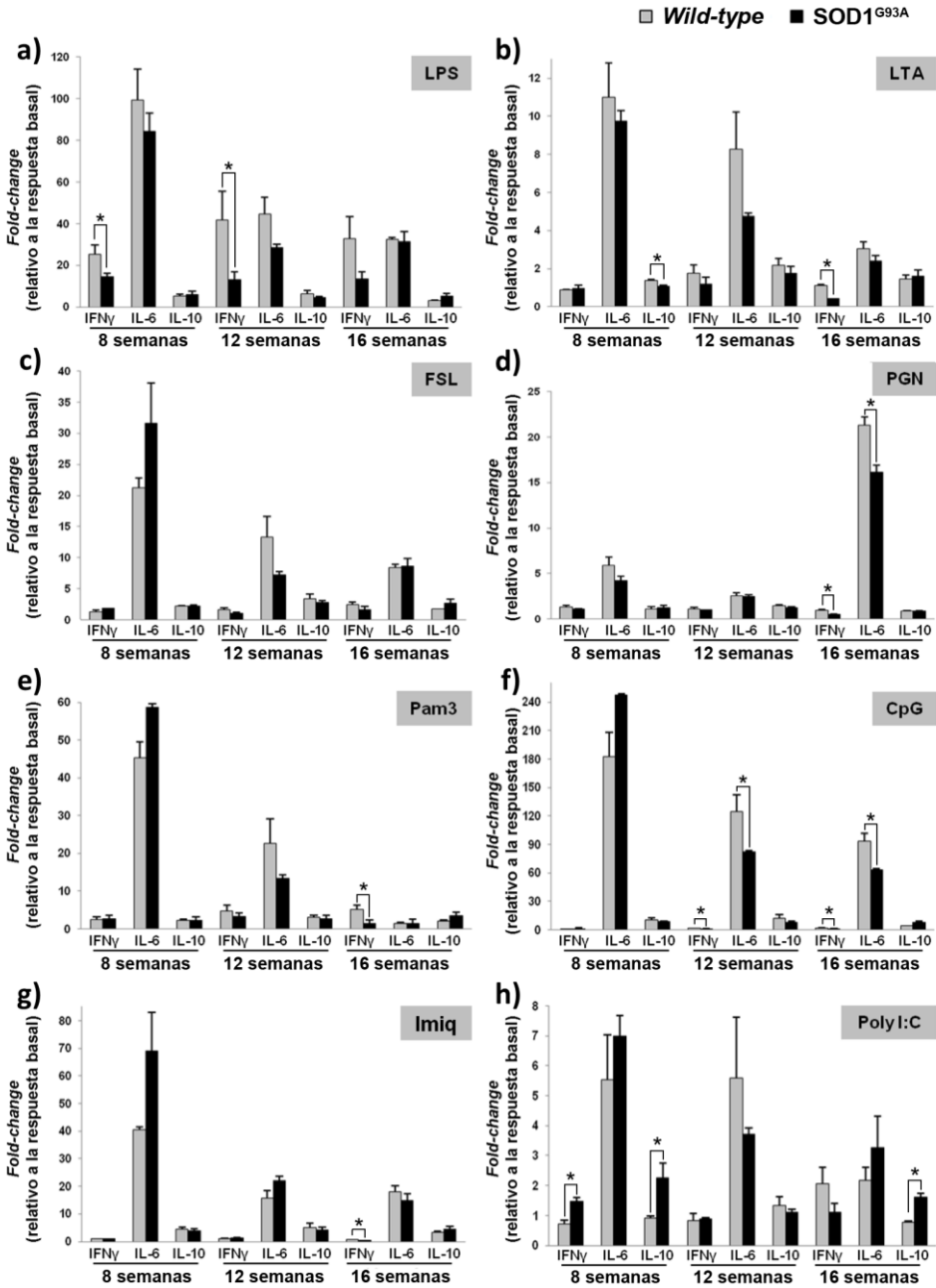


Figura 23. Niveles relativos de secreción de citoquinas en respuesta al tratamiento con ligandos de TLRs sobre esplenocitos de animales SOD1^{G93A} y *wild-type*. Los resultados se muestran como la relación entre los niveles de citoquinas medidos en los sobrenadantes de esplenocitos estimulados con los ligandos para cada grupo

experimental, y los niveles de secreción basal (*fold-change*). Los resultados se exponen como la media \pm S.E.M. Gris: *wild-type*; Negro: SOD1^{G93A}. El análisis estadístico empleado para comparar los niveles de las diferentes interleuquinas analizadas fue la prueba U de Mann Whitney para dos muestras independientes (* $p \leq 0.05$), comparando los animales SOD1^{G93A} con los *wild-type* de la misma edad. El estudio se realizó en tres puntos de edad: pre-sintomático (8 semanas), sintomático (12 semanas) y fase avanzada (16 semanas).

4. Niveles de expresión génica de TLRs en ELA: pacientes con ELA y animales SOD1^{G93A}

Dada la reducción general que observamos en la respuesta inmunitaria periférica mediada por TLRs en el contexto de la ELA, y el aumento de la respuesta derivada de la estimulación mediada específicamente por TLR-3, decidimos explorar los niveles de expresión de los genes que codifican los TLRs en los diferentes grupos experimentales, tanto en el modelo animal de ELA como en pacientes con dicha patología. El objetivo era revelar si las diferencias observadas en los niveles detectados de citoquinas eran consecuencia de diferencias en los niveles de expresión génica de los TLRs, o si estos dos parámetros no estaban relacionados.

Es importante mencionar que todos los TLRs, con la única excepción de TLR-3, transducen sus señales a través de la proteína adaptadora MyD88 provocando la producción de citoquinas proinflamatorias e inmunorreguladoras (Lehnhardt 2009). En base a ello exploramos los niveles de expresión de *Tlr3*, *Myd88*, *Tlr2* y *Tlr4* por qRT-PCR en esplenocitos aislados de animales SOD1^{G93A} a diferentes edades (8, 12 y 16 semanas), con el fin de estudiar si existían cambios en las diferentes fases de la enfermedad (Figura 24). Curiosamente, los resultados mostraron que aunque los niveles de *Tlr2* y *Tlr4* no se vieron alterados de forma significativa entre los diferentes grupos experimentales, la expresión de *Tlr3* y *Myd88* se encontraba reducida de forma significativa en los animales SOD1^{G93A}

de 8 semanas de edad, fase pre-sintomática, en comparación con los animales *wild-type* de la misma edad (Transgénicos vs. *wild-type*; *Myd88*: 0.56 ± 0.09 vs. 1.01 ± 0.06 , $p=0.034$; *Tlr3*: 0.64 ± 0.08 vs. 1.01 ± 0.09 , $p=0.043$) (Figura 24). Al comparar este grupo de animales con los SOD1^{G93A} de 12 y 16 semanas de edad, comprobamos que los menores niveles en fase pre-sintomática se reestablecen a las 12 semanas y se mantienen a las 16 semanas, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. En el caso de *Myd88*, $p=0.021$ y $p=0.027$ al comparar con los resultados a 12 y 16 semanas, respectivamente; y en el caso de *Tlr3*, $p=0.050$ al comparar con los niveles hallados a las 12 semanas (Figura 24).

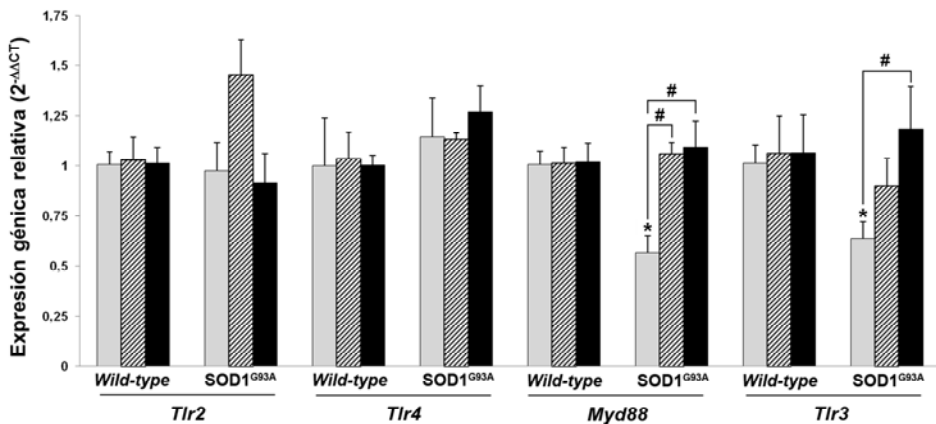


Figura 24. Niveles de expresión de los genes *Tlr2*, *3*, *4* y *Myd88* en esplenocitos de animales SOD1^{G93A} y *wild-type*. El estudio se realizó en tres puntos de edad: pre-sintomático (8 semanas), sintomático (12 semanas) y fase avanzada (16 semanas). Los resultados se exponen como la media \pm S.E.M. ($n=5$). El análisis estadístico empleado para comparar los diferentes grupos experimentales fue la prueba U de Mann Whitney para dos muestras independientes. (*) Diferencias respecto a los niveles detectados en los animales *wild-type* de la misma edad ($*p \leq 0.05$). (#) Diferencias obtenidas al comparar animales SOD1^{G93A} de diferentes edades ($\# p \leq 0.05$).

Con el fin de determinar si estas diferencias se presentan también en pacientes con ELA, decidimos analizar mediante qRT-PCR los niveles de expresión de

TLR2, *MyD88*, y *TLR3* en PBMC aisladas de muestras de sangre de pacientes con ELA inicial, pacientes con ELA definida e individuos sin patología conocida (controles) (Figura 25). Al igual que lo observado en el caso de los ratones *SOD1^{G93A}*, los resultados obtenidos en este caso mostraron que los niveles del gen *TLR2* no variaban de forma significativa entre los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, se detectaron niveles significativamente aumentados de los genes *MyD88* y *TLR3* en el grupo de pacientes con ELA inicial en comparación con los individuos control (*MyD88*: 1.35 ± 0.04 vs. 1.02 ± 0.08 , $p=0.039$; *TLR3*: 1.41 ± 0.11 vs. 1.03 ± 0.11 , $p=0.033$). Se observó también, que dichos niveles aumentados se restauraban en el grupo de pacientes que presentaban un estado más avanzado de la enfermedad, ELA definida (*MyD88*: 1.35 ± 0.04 vs. 0.94 ± 0.03 , $p=0.053$; *TLR3*: 1.41 ± 0.11 vs. 0.68 ± 0.05 , $p=0.034$) (Figura 25).

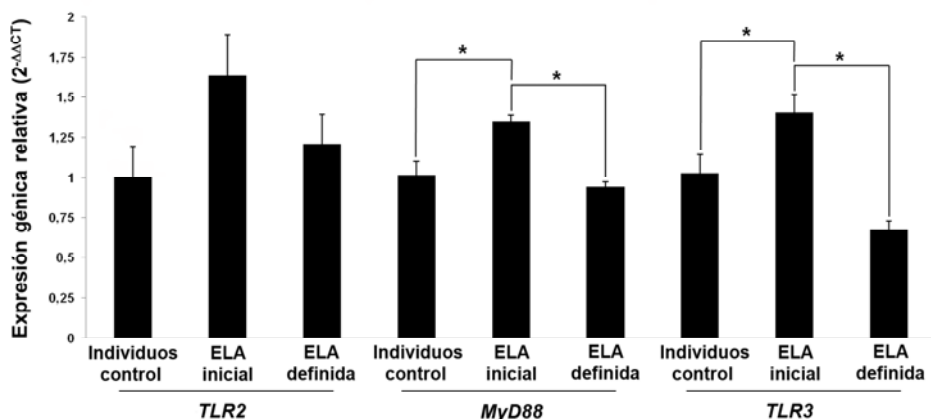


Figura 25. Niveles de expresión de los genes *TLR2*, *3*, y *MyD88* en PBMC de pacientes con ELA en diferentes fases de la enfermedad e individuos sin patología conocida. Los resultados se exponen como la media \pm S.E.M. El análisis estadístico empleado para comparar los diferentes grupos experimentales fue la prueba U de Mann Whitney para dos muestras independientes. (*) Diferencias obtenidas al comparar los diferentes grupos experimentales en términos de expresión de los genes analizados ($*p \leq 0.05$).

IV. DISCUSIÓN

Los resultados derivados del estudio del perfil de secreción basal de citoquinas en PBMC de pacientes con ELA muestran que los niveles de éstas tienden a aumentar en fases más avanzadas de la enfermedad en pacientes con ELA definida, siendo esta observación consistente con estudios anteriormente publicados en los que se muestran niveles elevados de IL-6 e IFN- γ en suero de pacientes diagnosticados con ELA (Ono et al. 2001; Liu et al. 2015). Los resultados derivados de nuestro estudio en el modelo animal de ELA se encuentran en concordancia con las observaciones anteriormente descritas en pacientes con esta patología, ya que observamos que los niveles de IL-6 y de IFN- γ se encuentran aumentados en los animales transgénicos en comparación con los animales *wild-type*, a medida que avanza la enfermedad en el modelo.

Curiosamente, el estudio que hemos realizado sobre pacientes con ELA muestra que a pesar de que los niveles basales en términos de secreción de IL-6 e IL-10 eran mayores en el grupo de pacientes con ELA definida, los PBMC de dichos pacientes son hipo-respondedores frente al estímulo con los ligandos LPS (TLR-4), Pam3 (TLR-2/1) y CpG (TLR-9), en comparación con la respuesta periférica en los individuos control. En concordancia con esta observación, el estudio realizado sobre el modelo animal de ELA muestra que a pesar de que los niveles basales de IL-6 e IFN- γ secretados por esplenocitos eran superiores en los animales en fase sintomática y en fase avanzada de la enfermedad, en dichas fases la respuesta también se encontraba disminuida frente a la estimulación con LPS (TLR-4), Pam3 (TLR-2/1), Imiq (TLR-7), LTA (TLR-2), PGN (TLR-2), y CpG (TLR 9), apoyando los hallazgos que nuestro estudio muestra en el contexto de pacientes con ELA. Se sabe que estos ligandos de TLRs precisan la proteína adaptadora MyD88 para transducir sus señales (Drouin-Ouellet & Cicchetti 2012), por ello estos resultados son consistentes con los niveles

reducidos de expresión del gen *Myd88* detectados en esplenocitos de animales en fase pre-sintomática de la enfermedad.

En relación a los niveles de expresión de *Tlr2* en esplenocitos de animales SOD1^{G93A}, existe una tendencia en la que observamos que dichos niveles se encuentran aumentados antes del inicio de los síntomas en el modelo, a las 12 semanas de edad de los animales. Sin embargo, esta tendencia carece de significancia estadística. Curiosamente, al evaluar los niveles de *TLR2* en PBMC de pacientes con ELA, observamos que los individuos con ELA inicial presentaban niveles aumentados para dicho gen. En este sentido, cabe mencionar, que Letiembre y colaboradores, demostraron que en animales de 8 semanas se detectaban niveles aumentados de expresión de *Tlr2* en médula espinal (Letiembre et al. 2009).

En este sentido, nuestro estudio muestra también que los niveles de expresión del gen *Tlr3* se encuentran significativamente reducidos en los animales en fase pre-sintomática. Curiosamente, la respuesta en términos de niveles de citoquinas secretadas en respuesta al estímulo con el agonista específico del receptor TLR-3, que es independiente de la proteína adaptadora MyD88, (Drouin-Ouellet & Cicchetti 2012), muestra un perfil opuesto al observado para el resto de TLRs estudiados, detectándose niveles aumentados de IL-10 e IFN- γ en los animales en fase pre-sintomática, y niveles aumentados de IL-10 en los animales en fase avanzada de la enfermedad, en comparación con los controles no transgénicos. Los niveles reducidos del gen *Tlr3* y la hiper respuesta asociada a TLR-3 (secreción de mayores niveles de IL-10 y de INF- γ) en esplenocitos de animales SOD1^{G93A} apoyan que pueda existir un fallo en la regulación de la respuesta mediada por TLRs en las células inmunitarias periféricas en el contexto de la ELA.

TLR-3 reconoce de forma específica ARN de doble cadena (dsRNA, del inglés *double-stranded RNA*), siendo ejemplo de ello el ligando Poly I:C, y juega un papel clave en la respuesta inmunitaria frente a infecciones por agentes víricos (Alexopoulou et al. 2001). Aunque hasta la fecha no existen estudios que asocien la ELA con infecciones provocadas por virus dsRNA, sí se han publicado estudios que respaldan el importante papel que juega la respuesta mediada por dsRNA–TLR-3 en la neuroinflamación asociada a los procesos neurodegenerativos (Salmina et al. 2015). Además, se ha observado que los niveles de expresión de *TLR3* se encuentran incrementados en los tejidos inflamados del sistema nervioso central (Mallard 2012).

Estudios publicados demuestran que la estimulación mediada por TLR-3 y TLR-9 en células T CD4 humanas promueve la supervivencia celular de las mismas sin incrementar su proliferación (Gelman et al. 2004). Por otra parte, estos autores demostraron que al evaluar la respuesta derivada del estímulo de TLR-4 y TLR-2 en células T CD4 humanas, no se observó ningún efecto (Gelman et al. 2004). Cabe mencionar, que evidencias experimentales señalan que la respuesta mediada por TLR-3 induce la secreción de IFN- γ en células T CD8+ and $\gamma\delta$ humanas, así como en células NKT aisladas de sangre periférica humana. (Saikh K.U. et al., J. Infect. Dis. 2003).

Es importante resaltar que aunque los niveles de expresión de *Tlr3* y *Myd88* se encuentran disminuidos en esplenocitos de animales SOD1^{G93A} en etapa pre-sintomática, los PBMC de pacientes con ELA inicial muestran niveles aumentados de los genes equivalentes en humanos, *TLR3* y *MyD88*. Cabe mencionar, que al no observarse este aumento en pacientes con ELA definida, la expresión de *TLR3* y/o *MyD88* podría ser considerada como potenciales biomarcadores de diagnóstico de la enfermedad en sus fases iniciales.

Algunos autores sostienen la idea del estudio de antagonistas de TLRs como agentes/candidatos neuroprotectores en los procesos patológicos con afectación de motoneuronas (De Paola et al. 2012). Sin embargo, es importante mencionar que la supresión total de las vías de señalización mediadas por TLRs puede desembocar en un estado inmunodeprimido no deseado (De Paola et al. 2012). En este sentido, existen trabajos que apoyan el papel neuroprotector que vías de señalización mediadas por la proteína adaptadora MyD88 tienen en el contexto de la ELA. Ejemplo de ello es el publicado en el año 2007, por Kang y sus colaboradores, donde demostraron que en animales tratados con células de médula ósea MyD88^{-/-} se adelanta el inicio de la enfermedad y se acelera la progresión de la misma, en comparación con animales trasplantados con células GFP control (Kang & Rivest 2007).

V. CONCLUSIONES

En base a nuestros hallazgos el modelo propuesto sería el siguiente:

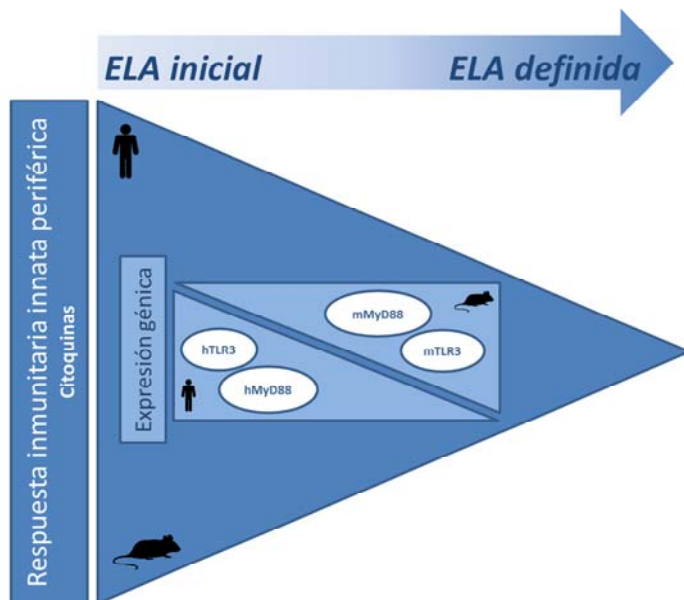


Figura 26. Esquema resumen de las observaciones de nuestro estudio sobre pacientes con ELA y el modelo $SOD1^{G93A}$. Reducción de la respuesta inmunitaria innata periférica a medida que progresa la enfermedad.

- ◆ Los PBMC de pacientes en fases avanzadas de la enfermedad son hiporrespondedores frente a la estimulación con ligandos específicos para los TLR estudiados: TLR2/1, TLR4 y TLR9.
- ◆ La respuesta mediada por: TLR2/1, TLR4, TLR9, TLR2, y TLR7, derivada de la estimulación en esplenocitos procedentes de ratones $SOD1^{G93A}$ es menor a la observada en el caso de ratones no transgénicos. Los esplenocitos de ratón en fases más avanzadas de la enfermedad son hiporrespondedores frente a la estimulación con ligandos específicos para los TLR estudiados.

De forma notable, el caso de TLR-3 (cuya ruta de señalización es MyD88-independiente) es inverso y su respuesta en el contexto de la ELA es mayor que lo normal (esplenocitos híper-respondedores).

- ◆ En el modelo SOD1^{G93A} la expresión para *Myd88* y *Tlr3* se ve reducida a las 8 semanas; dichos niveles de expresión se restauran a medida que progresa la enfermedad en el ratón.
- ◆ En los PBMC se detectan niveles de mRNA para *MyD88* y para *Tlr3* significativamente mayores en las fases iniciales de la enfermedad. En la fase avanzada no se observa dicho aumento.

VI. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 9. Niveles de interleuquinas secretados por PBMC humanas.

		IFN- γ		IL-6		IL-10	
		pg/mL \pm SEM	(valor P)	pg/mL \pm SEM	(valor P)	pg/mL \pm SEM	(valor P)
Individuos control	No tratado	11.7 \pm 3.4		10300 \pm 3020		405 \pm 134	
	LPS	23.2 \pm 6.6	(0.200)	17994 \pm 2792	(0.078)	930 \pm 145	(0.037*)
	CpG	21.4 \pm 7.2	(0.423)	11193 \pm 3285	(0.631)	453 \pm 154	(0.749)
	Pam3	26.5 \pm 6.2	(0.050*)	18275 \pm 3083	(0.078)	809 \pm 146	(0.050*)
ELA inicial	No tratado	26.2 \pm 11.4		12007 \pm 1289		535 \pm 162	
	LPS	84.1 \pm 53.8	(0.275)	28662 \pm 3247	(0.050*)	1284 \pm 22	(0.050*)
	CpG	44.2 \pm 13.5	(0.275)	13108 \pm 2627	(0.513)	706 \pm 244	(0.513)
	Pam3	66.5 \pm 31	(0.275)	27426 \pm 3278	(0.050*)	1123 \pm 58	(0.050*)
ELA definida	No tratado	15.8 \pm 5.3		14059 \pm 1435		556 \pm 68	
	LPS	22.6 \pm 6.2	(0.465)	21061 \pm 3243	(0.117)	1087 \pm 128	(0.016*)
	CpG	18 \pm 5.9	(0.917)	15537 \pm 1492	(0.347)	537 \pm 42	(0.917)
	Pam3	21.3 \pm 5.5	(0.347)	22727 \pm 3685	(0.117)	931 \pm 103	(0.028*)

Tabla 10. Niveles de interleuquinas secretados por esplenocitos aislados de ratón.

		IFN- γ		IL-6		IL-10	
		pg/mL \pm SEM	(valor P)	pg/mL \pm SEM	(valor P)	pg/mL \pm SEM	(valor P)
8 semanas <i>Wild-type</i>	No tratado	20.5 \pm 2.5		5.5 \pm 0.8		21.0 \pm 2.0	
	LPS	519 \pm 88.4		549.6 \pm 82.9		111.3 \pm 14.7	
	LTA	18.3 \pm 1.7		84.0 \pm 24.9		27.5 \pm 1.9	
	FSL	39.5 \pm 12.6		117.6 \pm 8.8		41.6 \pm 5.0	
	PGN	27.7 \pm 2.9		32.7 \pm 4.9		23.7 \pm 5.0	
	Pam3	91.7 \pm 41.6		250.2 \pm 23.1		45.9 \pm 7.3	
	CpG	22.4 \pm 2.7		1011 \pm 140		227.6 \pm 36.6	
	Imiq	18.2 \pm 2		277.1 \pm 53.4		95.4 \pm 12.7	
	Poly I:C	14.9 \pm 2.1		30.6 \pm 8.3		20.7 \pm 1.6	

Continuación Tabla 10: Niveles de interleuquinas secretados por esplenocitos aislados de ratón.

		IFN- γ		IL-6		IL-10	
		pg/mL \pm SEM	(valor P)	pg/mL \pm SEM	(valor P)	pg/mL \pm SEM	(valor P)
8 semanas SOD^{G93A}	No tratado	16.8 \pm 1.8	(0.175)	4.6 \pm 0.5	(0.347)	22.7 \pm 2.2	(0.602)
	LPS	372 \pm 129.5	(0.014*)	390.5 \pm 40.4	(0.175)	133.2 \pm 41.8	(0.917)
	LTA	16.4 \pm 2.3	(0.465)	55.9 \pm 11.0	(0.564)	30.2 \pm 6.2	(0.754)
	FSL	29.8 \pm 2	(0.917)	146.5 \pm 29.9	(0.347)	66.1 \pm 17.5	(0.251)
	PGN	18.4 \pm 1.2	(0.028*)	46.5 \pm 27.2	(0.050*)	28.2 \pm 6.1	(0.251)
	Pam3	44.9 \pm 5.7	(0.806)	271.8 \pm 33.8	(0.221)	68.3 \pm 19.8	(0.465)
	CpG	20.4 \pm 3.5	(0.754)	1.146 \pm 64.2	(0.251)	194.3 \pm 37.2	(0.602)
	Imiq	17.6 \pm 2.6	(0.754)	320.1 \pm 63.7	(0.142)	88.4 \pm 18.4	(0.754)
	Poly I:C	31.7 \pm 7.2	(0.027*)	32.4 \pm 3.2	(0.602)	51.5 \pm 11.0	(0.016*)
12 semanas Wild-type	No tratado	21.1 \pm 4.5		12.5 \pm 1.3		20.4 \pm 2.4	
	LPS	877.3 \pm 291.1		554.3 \pm 103.2		130.9 \pm 27.9	
	LTA	37.1 \pm 9.4		158.2 \pm 58.9		55.9 \pm 13.7	
	FSL	62.5 \pm 28.8		165.5 \pm 41.4		68.4 \pm 15.7	
	PGN	23.4 \pm 3.7		31.9 \pm 3.9		29.9 \pm 2.8	
	Pam3	97.7 \pm 34.2		282.8 \pm 80.0		62.8 \pm 10.4	
	CpG	30.9 \pm 2.7		1.558 \pm 211.5		245.0 \pm 80.4	
	Imiq	20.9 \pm 1.4		315 \pm 123		101.1 \pm 31.7	
	Poly I:C	17.7 \pm 4.6		69.6 \pm 25.2		27.1 \pm 6.1	
12 semanas SOD^{G93A}	No tratado	22.6 \pm 4.1	(0.602)	14.6 \pm 1.4	(0.175)	21.0 \pm 2.7	(0.754)
	LPS	293 \pm 84.6	(0.027*)	414 \pm 26.5	(0.465)	94.9 \pm 11.5	(0.465)
	LTA	26.4 \pm 8.1	(0.327)	87.0 \pm 26.2	(0.086)	36.5 \pm 7.9	(0.465)
	FSL	27.9 \pm 3.9	(0.248)	104.7 \pm 8.5	(0.465)	70.5 \pm 13.8	(0.754)
	PGN	24.5 \pm 2.2	(0.513)	36.6 \pm 2.4	(0.347)	26.2 \pm 2.4	(0.347)
	Pam3	74.2 \pm 22.1	(0.602)	193.1 \pm 16.0	(0.917)	55.9 \pm 2.6	(0.602)
	CpG	21.9 \pm 7.7	(0.021*)	1.200 \pm 106.3	(0.251)	163.9 \pm 42.3	(0.347)
	Imiq	28.1 \pm 2.9	(0.047*)	280.7 \pm 45.2	(0.043*)	88.8 \pm 18.6	(0.917)
	Poly I:C	20.7 \pm 1.3	(0.248)	49.0 \pm 5.7	(0.917)	23.1 \pm 1.9	(0.917)

Continuación Tabla 10: Niveles de interleuquinas secretados por esplenocitos aislados de ratón.

		IFN- γ		IL-6		IL-10	
		pg/mL \pm SEM	(valor P)	pg/mL \pm SEM	(valor P)	pg/mL \pm SEM	(valor P)
16 semanas <i>Wild-type</i>	No tratado	22.9 \pm 4.7		17.7 \pm 2.2		31.9 \pm 5.3	
	LPS	748 \pm 241		573.7 \pm 17.0		89.6 \pm 8.7	
	LTA	22.7 \pm 2.2		54.2 \pm 6.2		43.6 \pm 6.0	
	FSL	45.4 \pm 7.6		161.6 \pm 14.3		57.1 \pm 9.0	
	PGN	30.1 \pm 7.7		413.3 \pm 38.1		23.7 \pm 1.5	
	Pam3	119 \pm 22.4		24.4 \pm 4.7		56.5 \pm 4.5	
	CpG	28.5 \pm 5.4		1.651 \pm 155.0		140.4 \pm 11.7	
	Imiq	19.8 \pm 3.2		317.3 \pm 38.2		91.2 \pm 7.1	
	Poly I:C	38 \pm 10		38.4 \pm 7.7		25.8 \pm 3.5	
16 semanas SOD ^{G93A}	No tratado	39.3 \pm 15.6	(0.754)	23.7 \pm 4.0	(0.251)	28.6 \pm 3.8	(0.655)
	LPS	534 \pm 129	(0.602)	739.5 \pm 114.9	(0.465)	148.5 \pm 35.0	(0.655)
	LTA	16.9 \pm 1.5	(0.021*)	81.8 \pm 26.1	(0.806)	46.2 \pm 8.2	(0.754)
	FSL	66.4 \pm 20.3	(0.602)	259.0 \pm 60.3	(0.248)	77.2 \pm 17.5	(0.655)
	PGN	29.7 \pm 10	(0.386)	436.8 \pm 57.6	(0.513)	24.6 \pm 1.4	(0.465)
	Pam3	56.2 \pm 12	(0.076)	44.6 \pm 10.4	(0.021*)	99.5 \pm 36.3	(0.806)
	CpG	24 \pm 5.3	(0.347)	1399 \pm 109.2	(0.624)	226.8 \pm 61.8	(0.465)
	Imiq	19.1 \pm 6.1	(0.050*)	354.4 \pm 53.6	(0.465)	126.9 \pm 28.0	(0.602)
	Poly I:C	43.6 \pm 11.9	(0.917)	77.4 \pm 24.4	(0.175)	41.6 \pm 5.4	(0.021*)

**Capítulo 3. ESTUDIO METABOLÓMICO
SOBRE EL MODELO SOD1^{G93A}**

I. RESUMEN Y FUNDAMENTO TEÓRICO

En el contexto de esta enfermedad es de especial interés y preocupación el hecho de que no existan biomarcadores específicos para el diagnóstico y/o pronóstico de la ELA. Su diagnóstico se hace por exclusión, descartando patologías que cursan con un proceso similar en las fases iniciales. Todo ello tiene como consecuencia un riesgo de diagnóstico erróneo, con la posibilidad de que ciertos casos de ELA, en un principio, pasen desapercibidos por ser confundidos con otras patologías que también afectan a las motoneuronas y presentan una sintomatología inicial semejante. La complejidad del proceso fisiopatológico que tiene lugar en la ELA dificulta en gran medida estos estudios, de hecho, han sido muchas las investigaciones orientadas a este fin, aunque se precisaría, en general, de validaciones clínicas más exhaustivas.

El metaboloma refleja el fenotipo de un organismo dado y recientemente se ha mejorado enormemente la metodología seguida en estas aproximaciones, permitiendo el estudio de muestras con volumen limitado y origen poco invasivo. En este contexto, reseñar que hemos utilizado un equipo de Bruker Avance III 600 MHz en el que se incluye una criosonda que más allá de no requerir helio, permite doblar la sensibilidad del imán en uso. Las mejoras en sensibilidad, la ausencia de procesamiento de las muestras y la posibilidad de obtener valores cuantitativos de múltiples metabolitos, nos hacen pensar que el análisis metabolómico, en particular el basado en resonancia magnética en contraposición a métodos basado en HPLC-MALDI-TOF podría constituir una herramienta útil en el estudio de enfermedades de etiología poco conocida. En este sentido, decidimos explorar el perfil metabólico de diferentes regiones anatómicas de relevancia en el modelo SOD1^{G93A} con el fin de explorar potenciales marcadores de diagnóstico y pronóstico en la ELA.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Adquisición de las muestras para el estudio metabólico en el modelo SOD1^{G93A}

Los animales utilizados en este estudio fueron hembras B6SJL-Tg(SOD1^{G93A})1Gur/J, cuyas características se encuentran explicadas en el capítulo 1 (páginas 95 - 100). El manejo de la colonia, así como el genotipado de la misma, se encuentran también explicados en dicho apartado. El estudio se realizó con hembras a cuatro edades diferentes: 4 semanas y 8 semanas, como fase pre-sintomática; 12 semanas, como inicio de los síntomas; y 16 semanas, como fase avanzada de la enfermedad. Se emplearon animales de la misma colonia no portadores del transgen (*wild-type*) como controles en cada edad estudiada (Tabla 11).

Los ratones fueron anestesiados con xilacina:ketamina mediante inyección intraperitoneal. Tras comprobar que el animal estaba correctamente anestesiado se realizó la disección del mismo. Las muestras de tejido extraídas fueron colocadas inmediatamente en nitrógeno líquido para conseguir la congelación rápida de las mismas y evitar la degradación post-mortem que se sabe que altera de forma importante las concentraciones de los metabolitos. Se extrajo el cerebro, diseccionando el cráneo del animal cuidadosamente y conservando el hemisferio izquierdo. Seguidamente se extrajo el tallo cerebral, y por último, se extrajo la columna vertebral, que fue dividida en tres partes (cervical, dorsal y lumbar) basándonos en las curvaturas propias de la columna del animal. Haciendo pasar PBS a presión con una jeringa de 10mL y una aguja de 25G x 5/8" (0.5x16 mm), extrajimos la médula espinal de cada una de las partes. Todos los tejidos extraídos fueron colocados directamente y de forma

independiente en nitrógeno líquido, posteriormente se conservaron a -80°C hasta realizar el estudio de metabolómica (Tabla 11).

Tabla 11. Número de animales empleados en el estudio de metabolómica para cada uno de los tejidos analizados.

		SOD1 ^{G93A}				<i>wild-type</i>			
		4	8	12	16	4	8	12	16
Tejido	Semanas								
		Cerebro	5	11	8	12	6	12	6
	Tallo cerebral	5	10	7	8	6	10	8	6
	Médula espinal (cervical)	6	10	8	14	6	12	9	6
	Médula espinal (dorsal)	6	6	5	5	5	7	6	6
	Médula espinal (lumbar)	6	4	4	6	6	7	7	6

2. Análisis metabólico cuantitativo mediante espectroscopía de ¹H por resonancia magnética de alta resolución en ángulo mágico (¹H HR-MAS RMN)

2.1. Adquisición de los espectros de disoluciones modelo

En primer lugar se adquirieron espectros modelo para configurar una base de datos de conocimiento a priori que será utilizada para llevar a cabo el análisis cuantitativo mediante combinación lineal de los mismos, utilizando el programa LCMModel (del inglés *Linear Combination of Model Spectra* (Provencher 1993). La adquisición de los espectros modelo se llevó a cabo en un equipo Bruker Avance III 600 MHz, dotado con una sonda triple ¹H/¹³C/³¹P de HR-MAS (del inglés *high resolution-magic angle spinning*). Se adquirieron espectros

monodimensionales empleando secuencias de pulso/adquisición (zg) y de eco de espín (CPMG) a tiempo de eco de 144, ambas con presaturación de agua. En todos los casos las muestras se giraron a 5kHz formando un ángulo de 54.7° (ángulo mágico) respecto al campo principal (B_0), y la temperatura se mantuvo a 4°C. La adquisición de los espectros fue llevada a cabo por la Dra. María Luisa García Martín, responsable del laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (Bionand, Málaga). Para la adquisición de los espectros modelos se prepararon las siguientes disoluciones, siguiendo las indicaciones dadas en el manual del programa LCMModel. Las moléculas analizadas fueron: Acetato (Act), Alanina (Ala), Aspartato (Asp), Betaína (Bet), Colina (Cho), Fosforilcolina (PC), Glicerolfosforilcolina (GPC), Citrato (Cit), Creatina (Cr), Fosfocreatina (PCr), Ácido gamma-aminobutírico (GABA), Glicina (Gly), Glucosa (Glc), Glutamina (Gln), Glutamato (Glu), Glutación (GSH), Isoleucina (Ile), Lactato (Lac), Leucina (Leu), Mio-Inositol (Myo-Ins), Scyllo-Inositol (s-Ino), Fenilalanina (Phe), Fosfoetanolamina (PE), *N*-acetil aspartato (NAA), *N*-acetil-aspartil-glutamato (NAAG), Piruvato (Pyr), Succinato (Suc), Taurina (Tau), Treonina (Thr) y Valina (Val) (Tabla 12). A esta base de datos de metabolitos pequeños se añadieron además las señales, mediante simulación espectral, correspondientes a macromoléculas y lípidos. La determinación múltiple de ciertos metabolitos en el SNC se asocia a alteraciones relacionadas con los procesos neurodegenerativos (Niessen et al. 2007; Choi et al. 2009; Lawton et al. 2014; Kumar et al. 2010; Wuolikainen et al. 2012; Blasco et al. 2010; Blasco et al. 2014; Carew et al. 2011; Plaitakis & Constantakakis 1993; Tarasiuk et al. 2012; Wuolikainen et al. 2016).

2.2. Adquisición de los espectros de los extractos de tejido

Los espectros de los extractos de tejido nervioso se adquirieron utilizando las condiciones descritas en el apartado anterior. La temperatura a 4°C en este caso es fundamental ya que evita la degradación del tejido e impide alteraciones metabólicas debidas a actividad enzimática. Además de los espectros monodimensionales (zg y CPMG), se adquirieron espectros 2D ¹H-COSY, para ayudar a la correcta asignación de las señales en las regiones de mayor solapamiento (Righi et al. 2009).

Tabla 12. Metabolitos analizados en animales SOD1^{G93A} y *wild-type*.

Metabolito	Abreviatura
Alanina	Ala
Aspartato	Asp
Betaína	Bet
Colina	Cho
Creatina total	Cr+PCr
Ácido γ-aminobutírico	GABA
Glucosa	Glc
Glutamina	Gln
Glutamato	Glu
Glicina	Gly
Glicerolfosfocolina	GPC
Glutati3n	GSH
Lactato	Lac
Leucina	Leu
<i>N</i> -acetil aspartato	NAA
<i>N</i> -acetil aspartil glutamato	NAAG
Fosfocolina	PCho
Fenilalanina	Phe
Scyllo-Inositol	s-Ino
Taurina	Tau
Treonina	Thr

2.3. Análisis cuantitativo

Los espectros modelo adquiridos según el apartado anterior se utilizaron para construir una base de datos, “basis set”, específicamente diseñada para este estudio, que ha servido para analizar los espectros de los extractos de tejido nervioso empleando, según se describió en un estudio anterior, extractos de tumores cerebrales (Righi et al. 2009). Brevemente, el programa LCModel calcula el espectro que mejor se ajusta al experimental mediante la combinación lineal de los espectros modelo de la “basis set” correspondiente, lo que proporciona valores de concentración relativos. Para llevar a cabo una cuantificación absoluta es necesario disponer de una referencia interna. En nuestro caso utilizamos una señal generada electrónicamente (ERETIC; del inglés *Electronic Reference To access In vivo Concentrations*), según se describe en el estudio de Sitter (Sitter et al. 2010). Brevemente, el método consiste en producir una señal de radiofrecuencia sintética que se pre-calibra con respecto a una referencia. De esta manera se evitan los problemas derivados de otros sistemas de referencia interna, como el TSP, por ejemplo, que en el caso de la espectroscopía de HR-MAS plantea la duda de su localización, intra o extracelular, por un lado, y de la concentración real final, ya que una parte puede perderse fácilmente durante la manipulación de la muestra.

3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando el programa SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Los resultados referentes a los diferentes metabolitos analizados se expresan como la media \pm la desviación estándar de la media.

Independientemente del test estadístico empleado se considera que la diferencia observada es estadísticamente significativa cuando $p \leq 0.05$.

En un primer paso se seleccionaron aquellas variables que mostraban una cuantificación fiable de acuerdo a los valores de Cramer-Rao proporcionados por el programa LCMModel. Este programa proporciona la cota inferior de Cramer-Rao en porcentaje de concentración, considerando fiable sólo aquellas que están por debajo del 20%. Una vez seleccionadas las variables se procedió a un análisis de “outliers” y de normalidad, y se eliminaron los “outliers”. Seguidamente se procedió a la comparación de las medias mediante la prueba t-Student, puesto que en todos los casos se dispone de dos grupos, animales SOD1^{G93A} y animales control (*wild-type*). Los resultados de este análisis se muestran en las tablas ubicadas al final de este capítulo (páginas 233 - 237) y en el apartado de resultados: “Análisis metabólico: diferencias entre SOD1^{G93A} y *wild-type*”.

La evaluación de las diferencias entre las diferentes edades del animal analizadas se realizó empleando el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los resultados de este análisis se muestran en el apartado de resultados: “Análisis metabólico: diferencias en evolución”.

Además del análisis de medias y del estudio de comparaciones múltiples se llevó a cabo un análisis discriminante lineal (LDA) por pasos sucesivos. Como método de selección se empleó la minimización de Lambda de Wilks y, como método de validación cruzada, el conocido como LOO (*Leave One Out*).

III. RESULTADOS

1. Análisis metabolómico: diferencias entre animales SOD1^{G93A} y *wild-type*

El estudio metabolómico, acompañado del estudio quimiométrico, nos ha permitido detectar diferencias entre animales SOD1^{G93A} y animales no transgénicos. Al analizar nuestros resultados comprobamos que el perfil de metabolitos detectado en animales SOD1^{G93A} es diferente al observado en animales *wild-type*; variando tanto en función de la región analizada (cerebro, tallo cerebral y las tres regiones de la médula espinal) como en función de la edad del animal. Todos los resultados derivados de nuestro estudio los mostramos en las tablas ubicadas al final de este capítulo (páginas 233 - 237).

Observamos, que al analizar y comparar las concentraciones de los metabolitos detectados en el cerebro de los animales de 4 semanas (SOD1^{G93A} vs. *wild-type*), los animales SOD1^{G93A} muestran niveles superiores ($p \leq 0.050$) para nueve de los 20 metabolitos analizados (Ala, Asp, Cho, GABA, Gln, GPC, GSH, Leu y PCho) (Figura 27). Sin embargo, se observa una tendencia inversa en el caso de los metabolitos GSH y Gln en el tallo cerebral, mostrando concentraciones reducidas en los animales SOD1^{G93A} a las 4 semanas en comparación con los *wild-type*. En este sentido y también a nivel del tallo cerebral cabe mencionar que se observa una reducción de Cr+PCr y Phe. El perfil metabólico de la región cervical muestra también una concentración de Phe reducida en los animales SOD1^{G93A} en relación a los no transgénicos. Por otra parte, también observamos que en las regiones más distales, zona dorsal y lumbar, los animales SOD1^{G93A} de 4 semanas de edad presentan niveles aumentados de Tau respecto a los animales *wild-type* (Figura 27).

Los resultados derivados del estudio de animales de 8 semanas, arrojan un número menor de metabolitos con diferencias estadísticamente significativas en comparación con los observados en el caso de los animales de 4 semanas. Se detectan concentraciones de Asp reducidas en el cerebro de animales SOD1^{G93A} respecto a los animales *wild-type*. Cuando nos centramos en la región cervical de la médula espinal, observamos que la Leu aparece aumentada en los animales transgénicos. Al analizar las diferencias detectadas en la región lumbar, los resultados muestran niveles aumentados de Tau, Thr y GABA en los animales SOD1^{G93A} (Figura 27).

Los animales SOD1^{G93A} de 12 semanas, momento en el que se inician los síntomas en el modelo, presentan a nivel cerebral concentraciones aumentadas de Glc, y disminuidas de Thr, en comparación con los animales *wild-type* de la misma edad. La PCho se muestra reducida en el tallo cerebral de los animales SOD1^{G93A}. Mientras que el Asp y la Phe se encuentran en niveles aumentados en dichos animales en la región cervical. Los resultados derivados del análisis de la región lumbar muestran concentraciones disminuidas de Bet, PCho y GPC en los animales portadores del transgen (Figura 27).

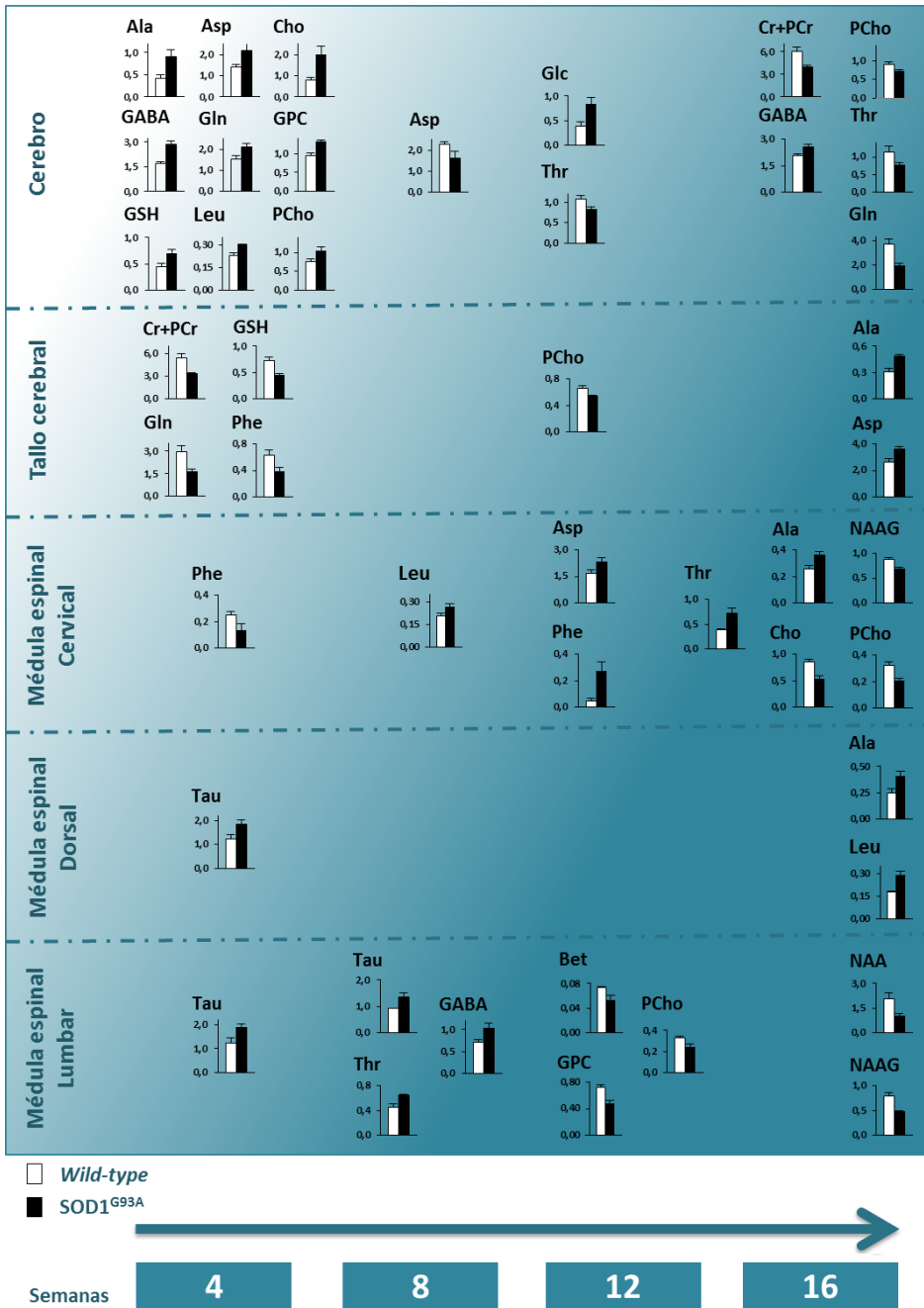


Figura 27. Estudio metabólico: diferencias entre animales SOD1^{G93A} y wild-type. Metabolitos analizados en animales SOD1^{G93A} a diferentes edades (4, 8, 12 y 16 semanas de edad) que muestran diferencias estadísticamente significativas en relación

a los niveles detectados en animales *wild-type*, en las diferentes regiones estudiadas: cerebro, tallo cerebral y tres zonas de la médula espinal (cervical, dorsal y lumbar). Los resultados se expresan como la media de las concentraciones ($\mu\text{mol/g}$ tejido) \pm la desviación estándar de la media. El análisis estadístico fue realizado empleando la prueba *t* de Student para dos grupos. Un valor de $p \leq 0.050$ refleja que las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas. En esta figura sólo se muestran los resultados que arrojan diferencias estadísticamente significativas, el conjunto global de resultados se encuentra en las tablas ubicadas al final de este capítulo (páginas 233 – 237). Ala: alanina; Asp: aspartato; Cho: colina; GABA: ácido γ -aminobutírico; Gln: glutamina; Glc: glucosa; GPC: glicerol fosfocolina; GSH: glutatión; Leu: leucina; PCho: fosfocolina; Thr: treonina; Cr+PCr: creatina + fosfocreatina (creatina total); Phe: fenilalanina; NAAG: *N*-acetilaspargilglutamato; NAA: *N*-acetilaspargato; Tau: taurina; Bet: betaína.

Por último, analizamos los resultados referentes a los animales SOD1^{G93A} de 16 semanas de edad, caracterizados por presentar un estado más avanzado de la enfermedad (Figura 27). En este sentido, el perfil metabólico del cerebro de los animales SOD1^{G93A} muestra concentraciones reducidas de Cr+PCr, PCho, Thr y Gln al ser comparados con sus equivalentes en el cerebro de animales *wild-type*. Con la única excepción del GABA, que se muestra aumentado en el cerebro de los animales transgénicos de esta edad. Los resultados referentes al tallo cerebral, muestran que la Ala y el Asp se encuentran en concentraciones superiores en los animales SOD1^{G93A} de 16 semanas respecto a los *wild-type*. Por otra parte, el perfil metabólico de la médula espinal de los animales SOD1^{G93A} de 16 semanas también arroja diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales no transgénicos. En la región cervical, la Cho, la PCho y NAAG se encuentran en concentraciones reducidas en los animales SOD1^{G93A}; mientras que la Ala y la Thr, se muestran aumentadas en dichos animales. Al explorar la región dorsal, observamos que los animales transgénicos presentan niveles aumentados de Ala y Leu. Sin embargo, la zona

lumbar de estos animales muestra niveles reducidos de NAAG y NAA (Figura 27).

2. Análisis metabólico: diferencias en evolución

Resulta también interesante explorar si el perfil metabólico de los animales SOD1^{G93A} varía a medida que avanza la enfermedad y comparar si evoluciona de la misma forma que en el caso de los animales no transgénicos de las mismas edades.

Los resultados derivados del estudio de la región cerebral de los animales *wild-type* mostraron que la concentración de Asp es superior a las 8 y a las 12 semanas en comparación a la observada a las 4 semanas de edad del animal. En este sentido, también observamos que a las 16 semanas de edad existe un incremento de los niveles de Gln, NAA y Cr+PCr y una reducción de Glc, tanto a las 12 como a las 16 semanas, en comparación con las concentraciones de dichos metabolitos observadas en los animales *wild-type* de 4 semanas de edad (Figura 28). Sin embargo, en el cerebro de los animales SOD1^{G93A} no observamos el mismo patrón, de hecho, ningún metabolito analizado aparece incrementado de forma significativa a medida que avanza la enfermedad en el modelo. En una fase avanzada de la enfermedad, 16 semanas, los animales SOD1^{G93A} presentan niveles reducidos de Ala, Cho, Glc y Thr, en comparación con las concentraciones observadas en los animales SOD1^{G93A} de 4 semanas de edad para dichos metabolitos (Figura 28). En este sentido, también observamos que en el cerebro de los animales SOD1^{G93A} de 8 semanas, la reducción observada de Glc y Thr es también significativa en comparación con los de 4 semanas de edad (Figura 28). La Thr también muestra una reducción significativa en los animales SOD1^{G93A} de 12 semanas en comparación con los de 4 semanas (Figura 28).

Al analizar los resultados del perfil metabólico del tallo cerebral y hacer un estudio comparativo entre las diferentes edades de los animales, no se observaron tantas diferencias como en el caso del cerebro. Es más, los resultados referentes a los animales *wild-type* muestran una reducción de los niveles de ciertos metabolitos a medida que crece el animal (Ala, Asp, GSH y Tau) (Figura 28). Las concentraciones de Ala en el tallo cerebral de animales *wild-type* a las 16 semanas son inferiores a las observadas a las 4 semanas de edad. En el caso de la Tau ocurre lo mismo, pero la reducción se hace también evidente a las 8 semanas en comparación con los animales *wild-type* de 4 semanas. Las concentraciones observadas de Asp en el tallo cerebral de estos animales ponen de manifiesto que una vez iniciados los síntomas (12 semanas) existe una reducción de las mismas (Figura 28). Por último, observamos que el GSH muestra niveles reducidos en los animales *wild-type* de 8 semanas en comparación con los animales de 4 semanas de edad (Figura 28). Por otra parte, en el caso de los animales SOD1^{G93A}, sólo dos metabolitos muestran diferencias significativas a nivel del tallo cerebral, Gln, que aumenta a las 8 semanas, y Cr+PCr, cuyos niveles se ven incrementados a las 12 semanas de edad, ambos metabolitos en comparación con las concentraciones de los mismos observadas a las 4 semanas de edad (Figura 28).

Más interesantes resultan ser las diferencias obtenidas al comparar el perfil metabólico de la región cervical de la médula espinal de los animales SOD1^{G93A} a medida que avanza la enfermedad. El mayor número de diferencias se concentran en la fase presintomática, los animales de 8 semanas presentan niveles aumentados de 7 de los 20 metabolitos analizados en comparación con los animales de 4 semanas (Asp, Gln, Glu, GSH, Leu, NAA y NAAG) (Figura 28). Una vez iniciados los síntomas asociados a este modelo, la comparación de los resultados metabólicos de la zona cervical arroja muchas menos diferencias

estadísticamente significativas; se observa un aumento de Ala y de NAAG a las 12 semanas y de Gln a las 16 semanas, así como una reducción de Leu a las 12 semanas de edad (Figura 28). Sin embargo, en el caso de los animales *wild-type*, el único metabolito que varía de forma significativa a medida que avanza la edad del animal es el NAAG, cuyos niveles van aumentando desde las 4 hasta las 16 semanas de edad (Figura 28).

A diferencia de lo que ocurre en la región cervical, el perfil metabólico de la región dorsal de los animales SOD1^{G93A} muestra que no existe un aumento de los niveles metabólicos detectados en la fase pre-sintomática, sino que por el contrario, los animales en fase más avanzada de la enfermedad muestran concentraciones reducidas de Cho, Gly, NAA y Tau en comparación con los animales de 4 semanas de edad (Figura 28). En el caso de la región cervical de los animales *wild-type* observamos que la reducción de Ala a las 8 semanas en relación a los niveles detectados a las 4 semanas, es la única diferencia significativa hallada (Figura 28).

Por último, cabe mencionar que al realizar esta misma aproximación con los resultados derivados del estudio metabólico de la región lumbar de los animales SOD1^{G93A} y *wild-type* no se observan diferencias estadísticamente, por ello los resultados no se muestran en la (Figura 28).

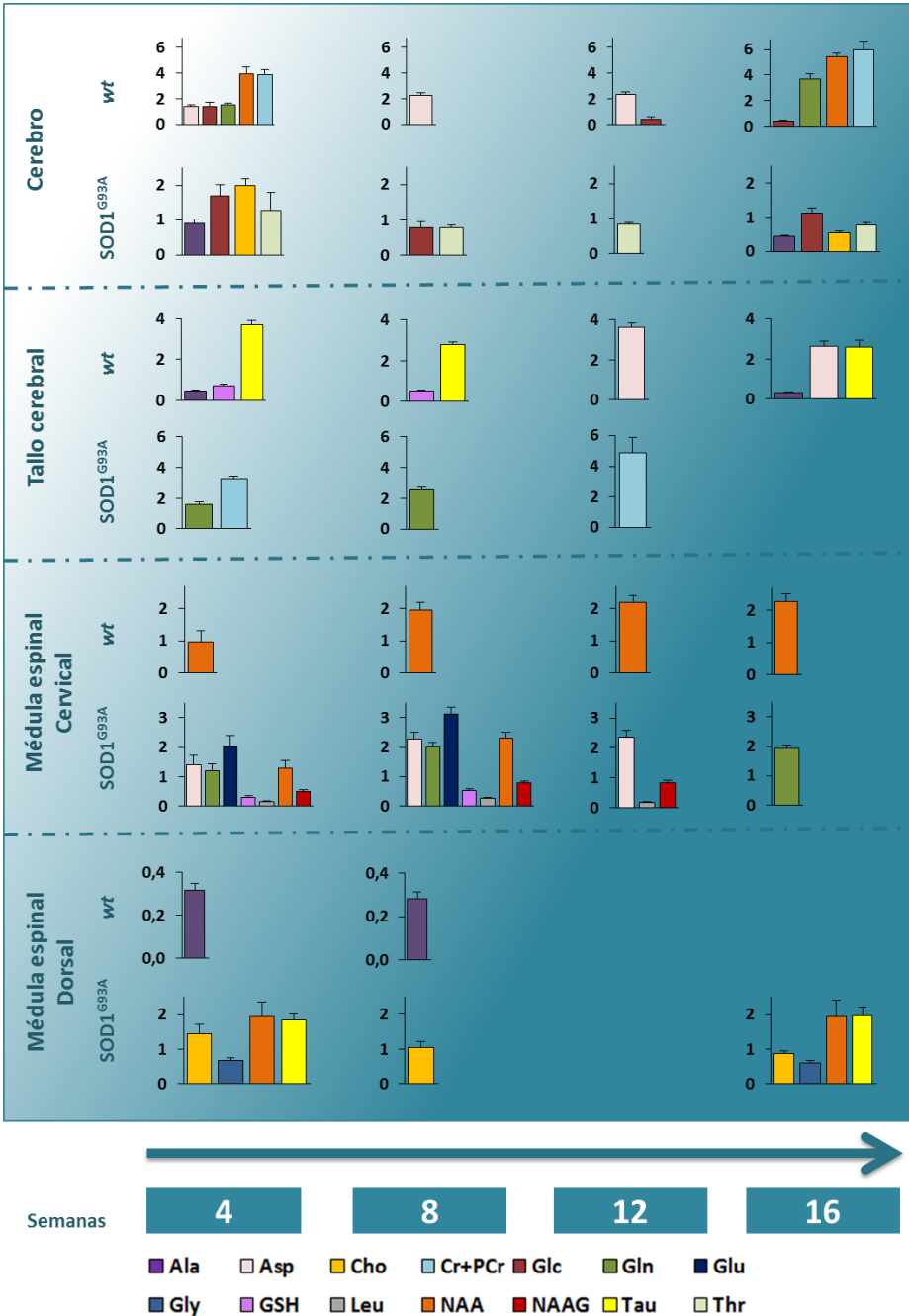


Figura 28. Estudio de metabolómica en animales SOD1^{G93A}: diferencias observadas a lo largo del tiempo. Evolución del perfil metabolómico a medida que avanza la edad del animal y en el caso de los animales SOD1^{G93A}, a medida que transcurre el proceso

patológico (4, 8, 12 y 16 semanas de edad). Los datos mostrados son aquellos cuyo análisis arroja diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo en las diferentes regiones estudiadas: cerebro, tallo cerebral y tres zonas de la médula espinal (cervical, dorsal y lumbar). Los resultados se expresan como la media de las concentraciones ($\mu\text{mol/g}$ tejido) \pm la desviación estándar de la media. El análisis estadístico fue realizado empleando la prueba ANOVA y el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Un valor de $p \leq 0.050$ refleja que las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas. En la figura sólo se muestran los resultados que arrojan diferencias estadísticamente significativas, el conjunto global de los datos se encuentra en las tablas ubicadas al final de este capítulo (páginas 233 – 237). Ala: alanina; Asp: aspartato; Cho: colina; Cr+PCr: creatina + fosfocreatina (creatina total); Glc: glucosa; Gln: glutamina; Glu: glutamato; Gly: glicina; GSH: glutatión; Leu: leucina; NAA: *N*-acetilaspártato; NAAG: *N*-acetilaspártilglutamato; Tau: taurina; Thr: treonina.

3. Análisis metabolómico: análisis discriminante

Otra de las aproximaciones llevadas a cabo con los resultados de metabolómica obtenidos fue la realización de un análisis discriminante incluyendo todos los datos obtenidos. En este sentido, observamos que con nuestras condiciones experimentales y con la aproximación metodológica seguida somos capaces de diferenciar las distintas regiones estudiadas independientemente de si se trata de animales *wild-type* o de animales SOD1^{G93A}, confirmando que el protocolo seguido es una herramienta válida para distinguir patrones metabólicos diferentes e indicando que el metabolismo en las diferentes regiones tiene un elevado nivel de robustez (Figura 29).

Observamos que el cerebro tiene un perfil metabolómico tan característico que permitiría clasificar de forma correcta al 100% de las muestras de cerebro analizadas, tanto en el caso de los animales SOD1^{G93A} como en el caso de los animales no portadores del transgen. El perfil metabolómico del tallo cerebral permitiría diferenciar claramente al 92.3% de las muestras de tallo cerebral de animales transgénicos, y al 83.3% de las correspondientes a animales no

transgénicos. Los datos derivados del análisis en las diferentes regiones de médula espinal no permiten una clasificación tan clara de la misma, ya que existe solapamiento entre los perfiles obtenidos para cada una de ellas.

Este análisis también nos muestra que de los 20 metabolitos analizados (Tablas en páginas 233 - 237), serían 10 metabolitos los que mejor permitirían diferenciar las distintas regiones de los animales $SOD1^{G93A}$, y 7 metabolitos en el caso de los animales no transgénicos. En el grupo de animales $SOD1^{G93A}$, los metabolitos que más peso tendrían en esta clasificación serían: Gly, GPC, GSH y PCho, seguidos de NAAG, NAA, Cr+PCr, Tau, Asp y Glc. Por otra parte, en el grupo de animales no transgénicos, los metabolitos que mejor diferenciarían las regiones serían: Tau, GPC, NAAG y Gly, seguidos de Glc, Thr y Cr+PCr.

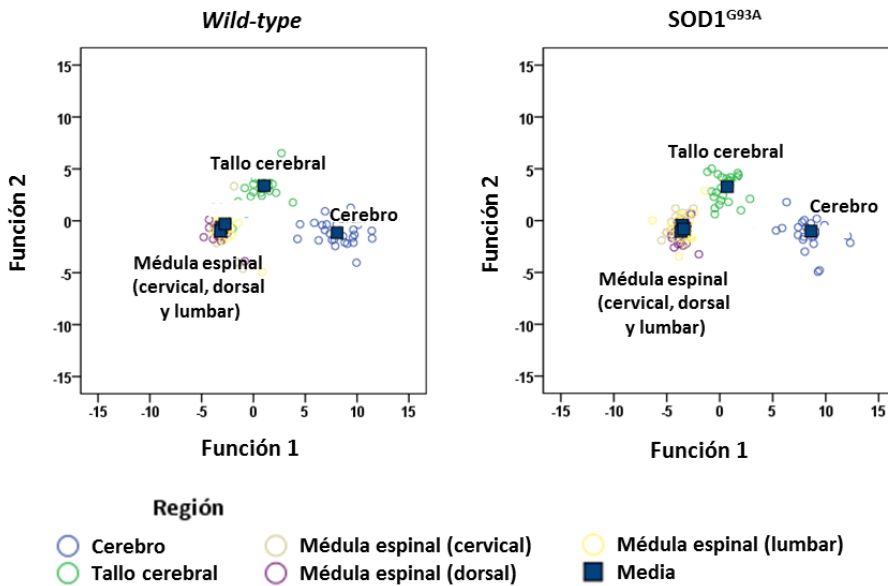


Figura 29. Discriminación de las diferentes regiones analizadas en base al perfil metabolómico detectado en los animales estudiados. a) Análisis discriminante de las regiones analizadas en animales wild-type. b) Análisis discriminante de las regiones analizadas en animales $SOD1^{G93A}$. Este análisis se hizo incluyendo todos los datos

referentes a los animales SOD1^{G93A} estudiados (todas las regiones exploradas: cerebro, tallo cerebral y las tres secciones de la médula espinal; a todas las edades consideradas: 4, 8, 12 y 16 semanas); y por otra parte, todos los referentes a los animales *wild-type*. Función 1 y 2 hace referencia a las variables que tienen mayor peso en la discriminación de las regiones. En el diagrama de animales *wild-type*: Función 1= $0.445 * \text{Glc} - 0.485 * \text{Gly} + 0.772 * \text{GPC} - 0.530 * \text{NAAG} + 0.957 * \text{Tau} + 0.115 * \text{Thr} - 0.005 * \text{Cr_PCr}$ y Función 2= $0.603 * \text{Glc} + 1.221 * \text{Gly} + 0.717 * \text{GPC} - 0.196 * \text{NAAG} + 0.022 * \text{Tau} + 0.504 * \text{Thr} - 1.351 * \text{Cr_PCr}$. En el diagrama de animales SOD1^{G93A}: Función 1= $0.182 * \text{Asp} + 0.171 * \text{Glc} - 0.833 * \text{Gly} + 0.507 * \text{GPC} + 0.477 * \text{GSH} + 0.393 * \text{NAA} - 0.427 * \text{NAAG} + 0.637 * \text{PCho} + 0.268 * \text{Tau} - 0.384 * \text{Cr_PCr}$ y Función 2= $0.742 * \text{Asp} + 0.677 * \text{Glc} + 0.282 * \text{Gly} + 0.618 * \text{GPC} - 0.145 * \text{GSH} + 0.595 * \text{NAA} - 0.258 * \text{NAAG} + 0.190 * \text{PCho} - 0.577 * \text{Tau} - 0.963 * \text{Cr_PCr}$. El estudio estadístico se ha realizado mediante un análisis discriminante lineal (LDA) por pasos sucesivos. Como método de selección se empleó la minimización de Lambda de Wilks y, como método de validación cruzada, el conocido como LOO (Leave One Out).

Con el fin de explorar si los perfiles metabolómicos detectados nos permitían predecir correctamente cuales serían los animales SOD1^{G93A} y poder así ser diferenciados de los animales *wild-type*, realizamos un análisis discriminante en el que dividimos los animales en dos grupos: i) animales de 4 y 8 semanas y ii) animales de 12 y 16 semanas. Nuestro objetivo era explorar en qué medida los resultados del análisis de metabolómica permitían diferenciar a los animales del modelo SOD1^{G93A} en fase pre-sintomática (4 y 8 semanas) de los animales no transgénicos a esas mismas edades, y los animales SOD1^{G93A} en fase sintomática (12 y 16 semanas) de los animales no transgénicos a esas mismas edades. Los resultados derivados de esta aproximación nos muestran el porcentaje de animales SOD1^{G93A} que se clasificarían correctamente como tal en base al perfil metabolómico observado en las diferentes regiones analizadas (Tabla 13). Esta aproximación también nos muestra cuales son los metabolitos más relevantes a la hora de clasificar a los animales, en función de la edad de los mismos (4 y 8 semanas vs. 12 y 16 semanas) y de la región analizada (Tabla 13).

Tabla 13. Estudio de metabolómica: capacidad de clasificación de animales SOD1^{G93A}.

Grado en el que el perfil metabolómico de las regiones analizadas nos permite clasificar a los animales SOD1^{G93A} en comparación con los animales no transgénicos.

Región	Cerebro		Tallo cerebral		Médula espinal (cervical)		Médula espinal (dorsal)		Médula espinal (lumbar)	
	4 y 8	12 y 16	4 y 8	12 y 16	4 y 8	12 y 16	4 y 8	12 y 16	4 y 8	12 y 16
SOD1^{G93A} clasificados correctamente (%)	62.5	95.5	85.7	92.3	75.0	73.7	75.0	100	90.0	60.0
No transgénicos clasificados correctamente (%)	66.7	83.3	87.5	78.6	94.1	86.7	83.3	100	100.0	100
Clasificados correctamente (%)	64.7	90.6	86.7	85.2	84.8	79.4	79.2	100	95.7	82.6
Falsos negativos (%)	37.5	5.0	14.3	7.7	25.0	26.3	25.0	0	10.0	40.0
Falsos positivos (%)	33.3	16.7	12.5	21.4	5.9	13.3	16.7	0	0	0
Metabolitos con mayor relevancia en clasificación de los animales	Tau	Glc Thr Cr+PCr	Leu NAAG PCho Tau	Ala GPC PCho	Bet Tau Cr+PCr	GSH NAAG	Glu NAAG	Glc NAAG Phe Tau	NAAG Tau	Ala Glc NAAG

SOD1^{G93A} clasificados correctamente (%): % de animales que eran SOD1^{G93A} y fueron clasificados como SOD1^{G93A} en base a su perfil metabolómico. No transgénicos clasificados correctamente (%): % de animales que eran *wild-type* y fueron clasificados

como *wild-type* en base a su perfil metabolómico. Clasificados correctamente (%): % promedio de animales SOD1^{G93A} y animales *wild-type* clasificados de forma correcta en base a su perfil metabolómico. Falsos negativos (%): % de animales que aun siendo SOD1^{G93A} fueron clasificados como *wild-type*. Falsos positivos (%): % de animales que aun siendo *wild-type* fueron clasificados como SOD1^{G93A}. Ala: alanina; Glc: glucosa; Glu: glutamato; GPC: glicerol fosfocolina; GSH: glutatión; Leu: leucina; PCho: fosfocolina; Thr: treonina; Cr+PCr: creatina + fosfocreatina (creatina total); Phe: fenilalanina; NAAG: N-acetilaspartilglutamato; Tau: taurina; Bet: betaína.

4. Resumen de los análisis de metabolómica

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la mayoría de las diferencias detectadas entre los animales SOD1^{G93A} y los animales no transgénicos en base al perfil metabolómico analizado, se hacen más evidentes a las 4 semanas de edad del animal, fase muy inicial de la enfermedad, y a las 16 semanas de edad, fase avanzada del proceso patológico en el modelo (Figura 27). El estudio comparativo entre animales transgénicos y animales no portadores del transgen no arroja tantas diferencias cuando se evalúan los animales a las 8 y a las 12 semanas, fase pre-sintomática y fase en la que se inician los síntomas en el modelo, respectivamente (Figura 27).

En este sentido, cabe resaltar que la mayor parte de las diferencias encontradas se detectan en la región cerebral. Cuando analizamos la evolución del panel de metabolitos estudiados en el cerebro de los animales, observamos que en fase pre-sintomática inicial, 4 semanas, los animales SOD1^{G93A} presentan un perfil metabolómico caracterizado por concentraciones superiores de ciertos metabolitos en comparación con las detectadas en los animales no transgénicos (Figura 27). Curiosamente, a medida que avanza la enfermedad en el modelo, este perfil no se mantiene, en fases más avanzadas se reducen las concentraciones de los metabolitos en el cerebro de los animales SOD1^{G93A} en

comparación con los *wild-type*. Una tendencia inversa se observa a nivel del tallo cerebral, aunque es menor el número de metabolitos que arrojan diferencias estadísticamente significativas (Figura 27). Observamos que a las 4 semanas, los animales SOD1^{G93A} presentan niveles reducidos de Cr+PCr, GSH, Gln y Phe; mientras que a las 16 semanas, no se mantienen dichas diferencias, sino que en contrapartida, se detectan niveles aumentados de Ala y Asp. Esta tendencia observada al analizar el tallo cerebral, se hace también patente en la región cervical de la médula espinal, pero en esta región son otros los metabolitos que arrojan diferencias estadísticamente significativas. Un patrón similar al descrito anteriormente en el cerebro, se observa cuando analizamos la evolución del perfil metabolómico en la región lumbar de los animales SOD1^{G93A}. En las fases más iniciales del modelo, los animales transgénicos muestran concentraciones superiores para ciertos metabolitos en comparación con los animales no transgénicos; sin embargo, a medida que avanza la enfermedad, los animales transgénicos presentan niveles significativamente reducidos para ciertos metabolitos (Figura 27).

Sería interesante mencionar, que la Ala se detecta en niveles aumentados en los animales transgénicos tanto a edades tempranas en el cerebro, como en una fase avanzada de la enfermedad en el tallo cerebral y en la región cervical y dorsal de la médula espinal (Figura 27). Por otra parte, se detectan niveles aumentados de Tau tanto en la región dorsal como en la lumbar de los animales en una fase pre-sintomática inicial, manteniéndose dicha diferencia a las 8 semanas de edad en la región lumbar (Figura 27).

Al analizar y comparar la evolución de los perfiles metabolómicos obtenidos para cada una de las regiones a medida que avanza la edad del animal, observamos que el mayor número de diferencias se detectan tanto en el cerebro como en la región cervical de los animales analizados (Figura 28). El

perfil metabolómico detectado en el cerebro de los animales SOD1^{G93A} muestra que en fase avanzada de la enfermedad se reducen los niveles de ciertos metabolitos, Ala, Cho, Glc y Thr. Sin embargo, este patrón no se observa en el caso de los animales *wild-type*, donde existe un aumento de Asp, Gln, NAA y Cr+PCr, a las 16 semanas de edad (Figura 28). Estos resultados ponen de manifiesto que el proceso patológico que tiene lugar en el modelo afecta al perfil metabolómico del cerebro de los animales SOD1^{G93A}. Por otra parte, resulta muy interesante el hecho de que en la región cervical de los animales SOD1^{G93A} en fase pre-sintomática se detecta un incremento de 7 de los 20 metabolitos analizados a las 8 semanas de edad, en comparación con los animales de 4 semanas de edad (Figura 28). Dicha observación no se hace patente en al analizar el perfil detectado en los animales *wild-type*, lo cual deja entrever que dichos metabolitos pudieran tener una implicación importante en el desarrollo de la enfermedad en sus fases iniciales.

El análisis estadístico realizado en el que agrupamos por una parte todos los resultados referentes a los animales SOD1^{G93A} y por otra parte los referentes a los animales no transgénicos, no sólo nos permite demostrar que la metabolómica cuantitativa permite distinguir patrones metabólicos diferentes y conocer la región a la que pertenece la muestra analizada en función del perfil metabolómico detectado, sino que también nos aporta información sobre el peso que ciertos metabolitos tienen a la hora de diferenciar las diferentes regiones en el grupo de animales transgénicos y en el grupo de animales no portadores del transgen (Figura 29). Como se mencionó anteriormente, en el caso de los animales SOD1^{G93A}, los metabolitos que más peso tendrían en esta clasificación serían: Gly, GPC, GSH y PCho, seguidos de NAAG, NAA, Cr+PCr, Tau, Asp y Glc. Por otra parte, en el caso de los animales no transgénicos, los metabolitos que mejor diferenciarían las regiones serían: Tau, GPC, NAAG y Gly,

seguidos de Glc, Thr y Cr+PCr. En base a estos resultados, observamos que en el grupo de animales SOD1^{G93A}, a diferencia de lo que ocurre en los animales no transgénicos, la Tau y el NAAG no tienen tanta relevancia en la diferenciación de las distintas regiones, este hecho podría deberse a que ambos metabolitos se ven alterados a medida que progresa la enfermedad en el modelo. En este sentido, es importante mencionar que tanto el GSH como la PCho son metabolitos con mucho peso a la hora de diferenciar regiones en los animales SOD1^{G93A} y no así en los animales no transgénicos, lo que podría significar que estos metabolitos también se asociarían a proceso patológico que acontece en el modelo.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que el perfil metabolómico asociado a las diferentes regiones exploradas permite clasificar en un alto porcentaje a los animales como transgénicos o no portadores del transgen en diferentes fases de la enfermedad: animales pre-sintomáticos (4 y 8 semanas) y animales sintomáticos (12 y 16 semanas) (Tabla 13). En la fase pre-sintomática del proceso patológico que tiene lugar en el modelo de ELA, el perfil metabolómico observado en el tallo cerebral y en la región lumbar de la médula espinal, permite clasificar en un alto porcentaje a los animales portadores del transgen (85.7 y 90%, respectivamente), con un bajo porcentaje de falsos negativos, es decir, permitiría diagnosticar a los animales afectados por la patología en un alto porcentaje en la fase pre-sintomática del modelo, con un porcentaje bajo de animales que a pesar de estar afectados no serían diagnosticados como tal. En ambas regiones, tanto la Tau como el NAAG cobran un papel relevante a la hora de clasificar a los animales (Tabla 13). Aunque son necesarios estudios más detallados, estos metabolitos podrían ser interesantes como marcadores en la fase pre-sintomática del modelo. Por otra parte, cuando analizamos los resultados referentes a la fase sintomática del modelo

SOD1^{G93A}, observamos que las regiones que permitirían diagnosticar correctamente y en mayor medida a los animales afectados, serían el cerebro y el tallo cerebral, los porcentajes en los que los animales se diagnosticarían correctamente en base al perfil metabólico de dichas regiones serían, 95.5 y 92.3%, respectivamente (Tabla 13). Siendo también bajo el porcentaje de animales afectados por la enfermedad que no se diagnosticarían como tal.

Por último, cabe mencionar que nuestros resultados demuestran que la metabolómica cuantitativa podría llegar a ser de gran relevancia en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes afectados con ELA, aunque es importante mencionar que el modelo SOD1^{G93A} representa a un bajo porcentaje de los pacientes afectados con esta enfermedad. Por lo que sería necesario un abordaje más amplio para poder concluir con más precisión y tratar de extrapolar los resultados obtenidos a pacientes con ELA, pudiendo de este modo comprobar si se confirman los hallazgos.

IV. DISCUSIÓN

Hasta la fecha, son escasos los estudios metabolómicos publicados con la intención de identificar biomarcadores específicos para el diagnóstico de la ELA. Algunos de ellos han sido realizados sobre muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y otros sobre muestras de sangre periférica de pacientes con ELA. En el contexto de esta enfermedad es importante resaltar que no sólo es necesario comparar los resultados obtenidos con individuos sin patología conocida, sino que se hace muy interesante también la comparación con pacientes afectados con otra enfermedad de motoneuronas, ya que permitiría discriminar otras patologías durante el diagnóstico. En este sentido, cabe mencionar que los estudios de metabolómica llevados a cabo en el contexto de la ELA no son todo lo específicos que se requeriría, debido en parte a la heterogeneidad entre los pacientes con ELA (Ganesalingam & Bowser 2010). Desde que se realizaron los primeros estudios de metabolómica en ELA, los avances en las técnicas empleadas en esta aproximación han ido permitiendo mejorar la especificidad, la sensibilidad y la reproducibilidad de estas mediciones.

La RMN *in vivo* es útil para evaluar la integridad de las neuronas y para examinar la progresión del proceso patológico en las neuronas motoras superiores durante el transcurso de la ELA en pacientes (Block et al. 1998; Abe et al. 2001; Suhy et al. 2002; Kalra et al. 2006). Sin embargo, esta aproximación presenta limitaciones en cuanto a la sensibilidad con la que es capaz de detectar ciertos metabolitos que se presentan en concentraciones inferiores al rango milimolar, GABA entre ellos (Pfeuffer et al. 1999), y en cuanto a la capacidad de analizar ciertas regiones más específicas en pacientes en fases iniciales de la enfermedad, como pueden ser el tallo cerebral (Pioro et al. 1999) y la región cervical de la médula espinal (Cooke et al. 2004). Es por ello por lo que actualmente los estudios de RMN *in vivo* en pacientes con ELA se orientan

hacia la exploración de la corteza motora o regiones subcorticales y se evalúan aquellos metabolitos que se presentan en mayor abundancia, requiriendo por tanto menor sensibilidad para su detección, como es el caso del NAA, que se observa de forma clara en el espectro *in vivo*.

En este sentido se hace especialmente interesante el estudio del perfil metabólico en extractos de tejidos de animales del modelo para el estudio de la ELA con el fin de identificar metabolitos que no hayan podido ser detectados en humanos. Fueron tres las preguntas que nos planteamos: i) si existían diferencias en cuanto al perfil metabólico de los animales SOD1^{G93A} en relación al observado en los animales wild-type en las diferentes regiones estudiadas y en función de la edad del animal (Análisis metabólico: diferencias entre animales SOD1^{G93A} y *wild-type*, página 201); ii) si a medida que progresaba el proceso patológico en el animal SOD1^{G93A} variaba el perfil metabólico asociado (Análisis metabólico: diferencias en evolución, página 205.), y por último iii) si era posible clasificar a los animales en función del perfil metabólico obtenido en las diferentes regiones (Análisis metabólico: análisis discriminante, página 209). Las respuestas a estas preguntas nos permitirían dilucidar i) si los metabolitos analizados pueden resultar interesantes como marcadores para el diagnóstico de la enfermedad, ii) si el patrón metabólico observado refleja el proceso patológico que acontece durante la enfermedad en el modelo y si pudiera llegar a resultar útil como marcadores para el pronóstico de la enfermedad, y por último iii) en qué medida la cuantificación de los metabolitos posibilitaría diagnosticar casos de ELA en función tanto de la región analizada como de la fase de evolución de la enfermedad.

Evidencias experimentales muestran que en modelos murinos para el estudio de la ELA, la médula espinal y el tallo cerebral son las regiones que se afectan en mayor medida durante el proceso patológico asociado a esta enfermedad

(Gurney et al. 1994; Chiu et al. 1995; Vukosavic et al. 2000; Joosten et al. 2001; Haenggeli & Kato 2002; Higgins et al. 2002; Zang & Cheema 2002; Chung et al. 2003; Angenstein et al. 2004; Niessen et al. 2006). Es por ello por lo que aparentemente las diferencias más evidentes en cuanto al perfil metabólico se reflejarían en dichas regiones.

Choi y colaboradores llevaron a cabo un estudio mediante espectroscopía por ¹H-NMR, tanto *in vitro* como *in vivo* en el modelo animal SOD1^{G93A} (Choi et al. 2009). Los resultados del análisis *in vitro* mostraron que en la región cervical y dorsal de la médula espinal de los animales SOD1^{G93A} a los 110 días (16 semanas aproximadamente) de edad revelan las diferencias más evidentes en relación a los animales *wild-type*. Se detectaron niveles reducidos de NAA y NAAG, y niveles aumentados de glutamato, taurina e inositoles (Choi et al. 2009). Sin embargo, nuestros resultados muestran que es en el cerebro de los animales analizados donde se observan el mayor número de diferencias entre los animales SOD1^{G93A} y los animales *wild-type* tanto a las 4 como a las 16 semanas de edad (Figura 27). Por otra parte, cabe también resaltar que cuando analizamos la evolución del perfil metabólico de la región cervical de los animales SOD1^{G93A} en diferentes fases de progresión de la enfermedad, observamos que dicha zona es la que muestra mayor número de diferencias entre los animales de 4 y de 8 semanas, es decir, antes de que se inicien los síntomas en el modelo, en las etapas iniciales de la enfermedad (Figura 28). En consonancia con esta observación, se hace también interesante mencionar que el perfil metabólico del cerebro de los animales SOD1^{G93A} también presenta cambios a medida que avanza la enfermedad en el animal (Figura 28).

En este sentido, es interesante mencionar que Choi y colaboradores realizan una aproximación más reduccionista que la nuestra, no hacen un estudio del cerebro completo sino que se centran en el perfil metabólico de la corteza

somatosensorial, este hecho podría poner de manifiesto que la regionalización en el estudio del perfil metabólico puede hacer que diferencias existentes pasen desapercibidas. De hecho, mostraron que la única diferencia estadísticamente significativa hallada entre los animales SOD1^{G93A} y los *wild-type* a nivel de la corteza somatosensorial fue un incremento en la concentración de glutamato en los animales SOD1^{G93A} a los 84 días (12 semanas) de edad (Choi et al. 2009). Siendo importante mencionar que cuando nosotros analizamos el cerebro de los animales transgénicos de 12 semanas no observamos niveles incrementados de glutamato en relación a los animales *wild-type*. Sin embargo, detectamos diferencias significativas respecto a las concentraciones de glutamato al comparar los animales SOD1^{G93A} en diferentes fases de progresión de la enfermedad, observando que en la región cervical de la médula espinal, los animales de 12 semanas presentan mayores concentraciones de glutamato que los de 8 semanas. Todo ello pone de manifiesto que el análisis de regiones específicas puede aportar información que puede llegar a verse eclipsada al analizar el tejido de una forma conjunta, como ocurre en el caso de las diferencias respecto a los niveles de glutamato demostradas por Choi y colaboradores en la corteza somatosensorial. Sin embargo, el estudio del perfil asociado al órgano completo arroja diferencias importantes que resultan de gran interés a la hora de clasificar a los animales en función del perfil metabólico asociado a dicho órgano, como ocurre en el caso del perfil asociado al cerebro de los animales SOD1^{G93A} (Tabla 13). Es por ello por lo que se hace interesante la combinación de ambas aproximaciones a la hora de explorar los cambios metabólicos asociados a la fisiopatología de la ELA.

Niessen y colaboradores realizaron un estudio empleando ¹H-NMR en el que analizaron diferentes regiones de animales SOD1^{G93A}: cerebelo, tallo cerebral,

corteza cerebral y médula espinal completa (Niessen et al. 2007). En este estudio fueron 4 las edades estudiadas y comparadas, 34, 75, 90 y 120 días (aproximadamente 5, 11, 13 y 17 semanas respectivamente) de edad, abarcando desde una fase pre-sintomática hasta una fase avanzada de la enfermedad. Estos autores analizaron 13 metabolitos: NAA, lactato, inositol, taurina, colina, creatina, aspartato, glutamina, succinato, glutamato, GABA, acetato y alanina. Cuando analizan el perfil metabólico de la corteza cerebral y del cerebelo, la taurina es el único metabolito que arroja diferencias estadísticamente significativas a medida que avanza la enfermedad en el modelo y al comparar los animales SOD1^{G93A} con los *wild-type* (Niessen et al. 2007). En nuestro estudio el análisis del extracto del tejido cerebral completo arroja más diferencias en este contexto, lo cual puede sugerir de nuevo la importancia de una aproximación que englobe el cerebro completo con la idea de que diferencias en cuanto al perfil metabólico de los animales no pasen desapercibidas (Figura 27 y Figura 28).

Los resultados referentes al análisis de la médula espinal completa muestran que una vez iniciados los síntomas en el modelo, existe una reducción de la concentración de aspartato, GABA, glutamina y NAA, en relación a los animales SOD1^{G93A} en fase presintomática (Niessen et al. 2007). La concentración de inositol y de glutamato se muestra también reducida pero en el punto más avanzado de la enfermedad analizado (Niessen et al. 2007). Por otra parte, observan que una vez iniciados los síntomas en los animales SOD1^{G93A} existe un incremento de la concentración de succinato, a los 90 y 120 días (aproximadamente 13 y 17 semanas, respectivamente) en comparación con los animales *wild-type* y con los animales de 75 días (11 semanas aproximadamente) de edad (Niessen et al. 2007). En nuestro estudio, la médula espinal fue dividida en tres regiones (cervical, dorsal y lumbar) mostrando cada

una de ellas un perfil metabólico diferente. En este sentido, cabe mencionar que a diferencia de estos autores, no observamos una reducción significativa de los metabolitos destacados por ellos (aspartato, GABA, glutamina, NAA y glutamato) a nivel de la médula espinal de los animales SOD1^{G93A} de 4 semanas en comparación con los que se encuentran en una fase más avanzada de la enfermedad. Es más, nuestros resultados muestran que en la región cervical de la médula espinal de los animales SOD1^{G93A} existe un incremento de la concentración de aspartato, glutamina, glutamato y NAA, entre otros, antes de iniciarse los síntomas en el modelo en comparación con los niveles observados a las 4 semanas de edad (Figura 28). Sin embargo, al analizar los resultados referentes a la región dorsal de los animales SOD1^{G93A} observamos que existe una reducción de la concentración de NAA en una fase avanzada de la enfermedad, 16 semanas, en comparación con la concentración de NAA a las 8 semanas de edad del animal (Figura 28).

Cuando Niessen y colaboradores analizan las diferencias a nivel de la médula espinal completa entre el perfil metabólico de los animales SOD1^{G93A} en relación a los animales *wild-type*, observan que las concentraciones detectadas para aspartato, GABA, glutamato, glutamina y NAA son inferiores en los animales SOD1^{G93A}, siendo esta diferencia más evidente en al iniciarse los síntomas y en las fases más avanzadas del proceso patológico en el modelo (Niessen et al. 2007). Los resultados derivados de la regionalización de la médula espinal (cervical, dorsal y lumbar) no muestran las mismas diferencias. Observamos que el aspartato se encuentra en concentraciones superiores en la región cervical de los animales SOD1^{G93A} una vez iniciados los síntomas, al igual que ocurre con la fenilalanina, la treonina y la alanina. Encontrándose únicamente reducidos en la zona cervical y en las fases más avanzadas de la enfermedad los niveles de NAAG, colina y fosfocolina. Nuestros resultados

muestran un perfil metabólico diferente en la región lumbar una vez iniciados los síntomas en el modelo. En consonancia con los hallazgos de Niessen y colaboradores cabe mencionar que nosotros también observamos una reducción de la concentración de NAA en los animales SOD1^{G93A} en relación a los animales *wild-type*, pero dicha diferencia es únicamente evidente en la región lumbar de la médula espinal. En este sentido, nuestros resultados también muestran que los animales SOD1^{G93A} en fase sintomática presentan también concentraciones reducidas de NAAG, betaína, fosfocolina y Glicerolfosfocolina, a nivel de la región dorsal y lumbar (Figura 27).

Niessen y colaboradores también analizan el perfil metabólico asociado al tallo cerebral completo (Niessen et al. 2007), a diferencia de Choi y colaboradores, que estudian el perfil asociado a la médula oblonga, es decir, en el segmento más bajo de los tres que constituyen el tallo cerebral (Choi et al. 2009), llevando a cabo de nuevo una aproximación más reduccionista que la seguida por nosotros y por Niessen y su equipo. El estudio del perfil asociado a la médula oblonga muestra diferencias a los 114 días (16 semanas aproximadamente) de edad, momento en el cual se detectaron niveles aumentados de glutamato, glutamina, glicina y taurina en comparación con los animales *wild-type* (Choi et al. 2009). En una fase más avanzada de la enfermedad, 142 días (20 semanas aproximadamente), no se observa el mismo patrón en dicha región. Existe incremento de las concentraciones de taurina y glutamina, y una reducción de la concentración de NAA en comparación con los animales *wild-type* (Choi et al. 2009). Cuando nosotros analizamos el perfil metabólico del tallo cerebral al completo y observamos que a las 16 semanas, a diferencia de lo anteriormente expuesto por Choi y colaboradores, los metabolitos que se encuentran en concentraciones aumentadas en los animales SOD1^{G93A} respecto a los *wild-type* son: treonina y alanina; mientras

que el NAAG, la colina y la fosfocolina se muestran en concentraciones reducidas respecto a los animales no transgénicos. A diferencia de las observaciones descritas por Choi, Niessen y su equipo muestran que los animales en una fase avanzada de la enfermedad (120 días/17 semanas) presentan concentraciones reducidas de glutamato y glutamina en relación a los animales *wild-type*, así como una reducción de la concentración de NAA. El único metabolito que detectan estos autores en niveles aumentados en los animales SOD1^{G93A} es el succinato, Choi y su equipo no muestran datos en relación a dicha molécula.

La taurina fue otro de los metabolitos analizados en nuestro estudio. Se considera un aminoácido endógeno presente en altas concentraciones en mamíferos (Jacobsen & Smith 1968). Evidencias experimentales han demostrado que la taurina media numerosos procesos fisiológicos en el SNC (Huxtable 1992; Huxtable 1989). Entre ellas cabe mencionar su papel en neuromodulación y en el mantenimiento de la homeostasis del calcio, su capacidad antioxidante y su implicación en procesos anti-inflamatorios y neuroprotectores (Revisado en (Menzie et al. 2012)). En este sentido es interesante resaltar que la taurina ha demostrado tener efectos neuroprotectores frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato (Chen et al. 2001; Wu et al. 2005), siendo éste uno de los mecanismos propuestos como desencadenantes del proceso neurodegenerativo asociado a la ELA (Mora 2011). Nuestros resultados muestran que existen niveles incrementados de taurina tanto en la región dorsal como en la lumbar de los animales en una fase pre-sintomática inicial, manteniéndose dicha diferencia a las 8 semanas de edad en la región lumbar. Una vez iniciados los síntomas no se observan concentraciones significativamente mayores de taurina en los animales SOD1^{G93A} en comparación con los animales *wild-type*. Es importante mencionar

también que la taurina es uno de los metabolitos con mayor peso a la hora de clasificar a los animales (SOD1^{G93A} vs. *wild-type*) en base al perfil metabólico observado en las diferentes regiones analizadas, tal y como se muestra en la tabla 13 (Tabla 13). En este sentido observamos que en el grupo de animales en fase pre-sintomática (4 y 8 semanas de edad), la taurina desempeña un papel importante a la hora de clasificar a los animales SOD1^{G93A} en función del perfil metabólico observado en cerebro, en tallo y en médula espinal, tanto región dorsal como región lumbar). En la región dorsal, la taurina se encuentra entre los metabolitos que permiten clasificar a los animales en una fase más avanzada de la enfermedad (12 y 16 semanas). Nuestro análisis muestra que la taurina constituye uno de los metabolitos con mayor peso a la hora de diferenciar a los animales SOD1^{G93A} de los animales *wild-type*. Curiosamente y en consonancia con nuestros resultados, Choi y colaboradores muestran que en la médula espinal de los animales SOD1^{G93A} de 110 días (16 semanas aproximadamente) de edad existen concentraciones incrementadas de taurina en relación a los animales *wild-type*. Por otra parte, en relación al estudio de Niessen y colaboradores cabe mencionar que ellos también observan diferencias en cuanto a las concentraciones de taurina. Sin embargo, dichas diferencias son a nivel de la corteza cerebral y del cerebelo a medida que avanza la enfermedad en el modelo y al comparar los animales SOD1^{G93A} con los *wild-type* (Niessen et al. 2007).

En relación a los metabolitos analizados en el modelo animal para el estudio de la ELA cabe mencionar que tanto el NAAG como el NAA son metabolitos que se sintetizan fundamentalmente en neuronas. Entre las funciones descritas para el NAA destacamos que proporciona acetil coenzima A para la síntesis de lípidos de las vainas de mielina y para el metabolismo energético del cerebro. Este metabolito constituye también el precursor del neurotransmisor NAAG (Arun et

al. 2010). Existen estudios que avalan que el NAAG presenta un papel clave en la regulación de la liberación de glutamato a nivel de la médula espinal, la degradación del NAAG por acción de la enzima carboxipeptidasa II da lugar a NAA y glutamato. Se ha demostrado que la inhibición de dicha enzima en un modelo animal para el estudio de la ELA retrasa de forma significativa el inicio de los síntomas asociados al modelo, la pérdida de neuronas motoras característica y prolonga la supervivencia de los animales (Ghadge et al. 2003). Dicha inhibición se llevó a cabo mediante la administración oral diaria del inhibidor 2-MPPA (ácido dioico 2-(3-mercaptopropil) pentano) a los animales SOD1^{G93A}, comenzando el tratamiento en fase pre-sintomática y continuándolo hasta el punto final del estudio (Ghadge et al. 2003).

En este sentido, se hace interesante mencionar que en nuestro estudio, el NAAG también constituye, junto a la taurina, uno de los metabolitos con mayor relevancia a la hora de clasificar a los animales como SOD1^{G93A} o animales no transgénicos. Concretamente, el NAAG destaca como variable de peso en la clasificación en base al perfil metabolómico observado en las tres regiones de la médula espinal, así como en base al perfil observado en el tallo cerebral (en el grupo de animales en fase presintomática: 4 y 8 semanas) (Tabla 13). Los resultados obtenidos muestran que la concentración de NAAG en la médula espinal de los animales SOD1^{G93A} en fase avanzada de la enfermedad (16 semanas) es inferior a la observada en los animales *wild-type* (Figura 27). Estas observaciones son consistentes con la reducción de la concentración de NAAG observada por Choi y colaboradores en la médula espinal de los animales SOD1^{G93A} en fase avanzada de la enfermedad (110 días/16 semanas) (Choi et al. 2010). Estos hallazgos en el modelo animal son consistentes con evidencias experimentales publicadas en pacientes con ELA (postmortem) y en el modelo SOD1^{G93A} en fase final en las que se observa una reducción de NAAG en la

médula espinal de los sujetos estudiados (Plaitakis & Constantakakis 1993; Choi et al. 2009). Curiosamente, Plaitakis y colaboradores, demostraron que en extractos de tejido de médula espinal de pacientes con ELA postmortem se observan concentraciones de NAAG reducidas. Concretamente se observa una reducción del 40-48% de las mismas respecto a los individuos sin patología conocida empleados como referencia (Plaitakis & Constantakakis 1993). Estos autores no observan diferencias en cuanto a los niveles de NAAG en el cerebro de los pacientes con ELA (Plaitakis & Constantakakis 1993). Esta observación es también consistente con nuestros resultados, ya que en el cerebro de los animales SOD1^{G93A} tampoco se detectan diferencias en cuanto a los niveles de NAAG en comparación con los animales *wild-type* (Figura 27).

Por otra parte, cabe mencionar que estos autores observan en relación al NAA las mismas diferencias anteriormente explicadas para el NAAG, es decir, reducción de las concentraciones de NAA a nivel de la médula espinal de pacientes con ELA sin verse alterados los niveles de dicho metabolito en el cerebro (Plaitakis & Constantakakis 1993). Sin embargo, en los animales SOD1^{G93A} analizados, únicamente detectamos niveles reducidos de NAA en la región lumbar de la médula espinal (Figura 27).

Por último, cabe resaltar un punto muy importante a tener en cuenta en los estudios de metabolómica, el procesamiento de las muestras, consensuar las condiciones bajo las cuales debe llevar a cabo tanto la toma de las mismas como la conservación y manipulación hasta realizar la medición de metabolitos. En este sentido, en el año 2009, Wuolikainen y colaboradores, publicaron un trabajo en el que se mostraban las condiciones óptimas para el estudio de metabolómica en muestras de LCR de pacientes con ELA (Wuolikainen et al. 2009). La ineludible necesidad de biomarcadores específicos para el diagnóstico

y pronóstico de la ELA, hace que sea esencial consensuar los procedimientos con el fin de agilizar el avance hacia el hallazgo de los mismos.

V. CONCLUSIONES

- ◆ El estudio del perfil metabólico asociado al cerebro en su totalidad constituye una herramienta de gran importancia en el contexto de la ELA, aportando datos que pasan desapercibidos al llevar a cabo una aproximación más reduccionista y restringir el estudio a zonas más específicas del cerebro.
- ◆ Al comparar el perfil metabólico analizado en los animales SOD1^{G93A} respecto al observado en los wild-type se pone de manifiesto que la mayor parte de las diferencias se hacen evidentes en la fase más inicial estudiada (4 semanas) así como en la fase más avanzada de la enfermedad (16 semanas).
- ◆ El cerebro y la zona cervical de la médula espinal son las regiones donde varía en mayor medida el perfil metabólico durante el transcurso del proceso patológico en el modelo SOD1^{G93A}.
- ◆ Nuestros resultados muestran que el perfil metabólico asociado a las diferentes regiones exploradas permite clasificar en un alto porcentaje a los animales como transgénicos o no portadores del transgen en diferentes fases de progresión de la enfermedad.
- ◆ La taurina y el NAAG constituyen los dos metabolitos con mayor peso a la hora de clasificar a los animales como SOD1^{G93A} o como animales no transgénicos en base al perfil metabólico analizado.

VI. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 14. Datos del estudio de metabolómica: Cerebro

Metabolito ($\mu\text{mol}/\text{g}$ tejido)	CEREBRO											
	4 semanas			8 semanas			12 semanas			16 semanas		
	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.
Ala	0.41 \pm 0.08	0.91 \pm 0.16	0.015	0.4 \pm 0.02	0.5 \pm 0.05	0.076	0.48 \pm 0.09	0.48 \pm 0.04	0.957	0.43 \pm 0.04	0.43 \pm 0.03	0.993
Asp	1.42 \pm 0.12	2.2 \pm 0.31	0.033	2.26 \pm 0.19	1.62 \pm 0.11	0.013	2.35 \pm 0.22	2.11 \pm 0.11	0.301	2.07 \pm 0.13	1.82 \pm 0.12	0.223
Bet	0.12 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.724	0.12 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.774	0.12 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.459	0.13 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.068
Cho	0.78 \pm 0.11	2 \pm 0.4	0.017	1.36 \pm 0.28	1.43 \pm 0.28	0.859	1.21 \pm 0.21	1.22 \pm 0.19	0.978	1.21 \pm 0.11	1.13 \pm 0.14	0.700
Cr+PCr	3.86 \pm 0.46	5.04 \pm 0.29	0.066	4.34 \pm 0.29	4.46 \pm 0.24	0.752	5.36 \pm 0.26	4.62 \pm 0.4	0.184	5.98 \pm 0.65	3.89 \pm 0.23	0.002
GABA	1.71 \pm 0.11	2.84 \pm 0.22	0.002	2.43 \pm 0.27	2.7 \pm 0.26	0.491	2.16 \pm 0.19	2.28 \pm 0.14	0.612	2.06 \pm 0.11	2.58 \pm 0.16	0.045
Glc	1.42 \pm 0.32	1.71 \pm 0.52	0.637	0.67 \pm 0.1	0.78 \pm 0.18	0.586	0.39 \pm 0.08	0.83 \pm 0.14	0.025	0.4 \pm 0.07	0.54 \pm 0.06	0.196
Gln	1.51 \pm 0.18	2.12 \pm 0.15	0.034	2.14 \pm 0.28	2.4 \pm 0.28	0.531	2.95 \pm 0.37	2.8 \pm 0.4	0.806	3.7 \pm 0.41	1.93 \pm 0.16	0.000
Glu	5.88 \pm 0.4	7.59 \pm 1.05	0.136	7.83 \pm 0.52	7.47 \pm 0.31	0.576	7.81 \pm 0.81	8.02 \pm 0.4	0.809	7.97 \pm 0.4	7.78 \pm 0.27	0.706
Gly	0.18 \pm 0.03	0.25 \pm 0.03	0.115	0.23 \pm 0.02	0.24 \pm 0.02	0.909	0.25 \pm 0.02	0.25 \pm 0.03	0.912	0.26 \pm 0.03	0.24 \pm 0.01	0.372
GPC	0.95 \pm 0.08	1.32 \pm 0.04	0.006	1.45 \pm 0.15	1.53 \pm 0.12	0.687	1.6 \pm 0.18	1.56 \pm 0.18	0.885	1.59 \pm 0.19	1.4 \pm 0.11	0.377
GSH	0.45 \pm 0.07	0.71 \pm 0.07	0.024	0.78 \pm 0.09	0.75 \pm 0.07	0.800	0.69 \pm 0.04	0.64 \pm 0.07	0.545	0.84 \pm 0.09	0.69 \pm 0.11	0.378
Thr	1.05 \pm 0.15	1.27 \pm 0.12	0.289	0.84 \pm 0.08	0.88 \pm 0.05	0.678	1.08 \pm 0.08	0.83 \pm 0.06	0.035	1.15 \pm 0.16	0.76 \pm 0.08	0.027
Lac	8.77 \pm 0.96	12.21 \pm 1.43	0.070	9.49 \pm 0.69	9.71 \pm 0.68	0.822	10.32 \pm 0.53	10.01 \pm 0.76	0.763	12.03 \pm 1.02	9.85 \pm 0.66	0.084
Leu	0.23 \pm 0.02	0.3 \pm 0.01	0.017	0.24 \pm 0.01	0.27 \pm 0.02	0.287	0.24 \pm 0.01	0.27 \pm 0.02	0.244	0.25 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01	0.551
NAA	3.96 \pm 0.51	5.16 \pm 0.61	0.167	4.51 \pm 0.25	4.95 \pm 0.27	0.247	4.68 \pm 0.29	5.07 \pm 0.21	0.285	5.45 \pm 0.23	5.37 \pm 0.19	0.819
NAAG	0.3 \pm 0.01	0.36 \pm 0.04	0.228	0.39 \pm 0.03	0.32 \pm 0.03	0.128	0.37 \pm 0.05	0.36 \pm 0.05	0.891	0.36 \pm 0.04	0.32 \pm 0.02	0.345
Pcho	0.77 \pm 0.06	1.05 \pm 0.1	0.043	0.81 \pm 0.09	0.78 \pm 0.03	0.776	0.79 \pm 0.04	0.74 \pm 0.11	0.722	0.9 \pm 0.06	0.72 \pm 0.04	0.023
Phe	0.63 \pm 0.11	0.88 \pm 0.1	0.128	0.88 \pm 0.19	0.68 \pm 0.11	0.369	0.76 \pm 0.29	0.64 \pm 0.12	0.673	0.87 \pm 0.2	0.54 \pm 0.1	0.121
Tau	6.38 \pm 0.64	9.15 \pm 1.2	0.061	6.99 \pm 0.65	7.92 \pm 0.34	0.230	7.16 \pm 0.86	7.63 \pm 0.65	0.661	7.77 \pm 0.46	7.97 \pm 0.36	0.749

Tabla 15. Datos del estudio de metabolómica: Tallo cerebral

Metabolito ($\mu\text{mol/g}$ tejido)	4 semanas			8 semanas			12 semanas			16 semanas		
	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.
Ala	0.47 \pm 0.04	0.52 \pm 0.08	0.618	0.42 \pm 0.03	0.47 \pm 0.05	0.368	0.43 \pm 0.03	0.45 \pm 0.03	0.744	0.31 \pm 0.04	0.48 \pm 0.02	0.002
Asp	3.1 \pm 0.15	2.86 \pm 0.29	0.452	3.2 \pm 0.25	3.46 \pm 0.33	0.538	3.63 \pm 0.2	4.03 \pm 0.4	0.375	2.63 \pm 0.27	3.6 \pm 0.24	0.019
Bet	0.09 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.591	0.09 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.902	0.08 \pm 0	0.08 \pm 0.01	0.754	0.07 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.375
Cho	1.83 \pm 0.33	1.78 \pm 0.26	0.915	1.46 \pm 0.14	1.6 \pm 0.2	0.571	1.24 \pm 0.12	1.48 \pm 0.08	0.137	1.09 \pm 0.09	1.39 \pm 0.17	0.223
Cr+PCr	5.38 \pm 0.67	3.3 \pm 0.14	0.022	4.31 \pm 0.41	4.22 \pm 0.25	0.853	5.17 \pm 0.3	4.88 \pm 0.41	0.584	5.29 \pm 0.89	4.75 \pm 0.42	0.560
GABA	1.88 \pm 0.16	2.06 \pm 0.22	0.530	1.69 \pm 0.03	1.87 \pm 0.13	0.229	1.99 \pm 0.06	1.96 \pm 0.12	0.833	1.53 \pm 0.03	1.85 \pm 0.11	0.067
Glc	1.8 \pm 0.63	1.65 \pm 0.44	0.857	2.19 \pm 0.44	2.57 \pm 0.17	0.817	3 \pm 0.27	3.06 \pm 0.34	0.900	2.44 \pm 0.3	2.64 \pm 0.31	0.672
Gln	2.92 \pm 0.42	1.61 \pm 0.17	0.026	2.49 \pm 0.3	2.57 \pm 0.17	0.817	3 \pm 0.27	3.06 \pm 0.34	0.900	2.44 \pm 0.3	2.64 \pm 0.31	0.672
Glu	4.94 \pm 0.19	4.78 \pm 0.48	0.761	5.08 \pm 0.16	5.37 \pm 0.15	0.205	5.81 \pm 0.3	5.4 \pm 0.16	0.304	5.04 \pm 0.68	5.62 \pm 0.19	0.371
Gly	0.82 \pm 0.09	0.64 \pm 0.04	0.148	0.75 \pm 0.06	0.75 \pm 0.05	0.938	0.88 \pm 0.04	0.86 \pm 0.06	0.769	0.7 \pm 0.07	0.76 \pm 0.06	0.520
GPC	1.39 \pm 0.17	1.38 \pm 0.06	0.952	1.34 \pm 0.1	1.26 \pm 0.1	0.585	1.52 \pm 0.13	1.29 \pm 0.03	0.126	1.17 \pm 0.2	1.05 \pm 0.11	0.598
GSH	0.72 \pm 0.07	0.45 \pm 0.02	0.010	0.5 \pm 0.05	0.65 \pm 0.06	0.070	0.57 \pm 0.01	0.67 \pm 0.12	0.463	0.53 \pm 0.04	0.56 \pm 0.09	0.803
Thr	1.09 \pm 0.16	0.74 \pm 0.11	0.142	0.79 \pm 0.09	0.98 \pm 0.12	0.236	1.01 \pm 0.17	0.96 \pm 0.14	0.827	1.32 \pm 0.28	0.89 \pm 0.15	0.172
Lac	10.62 \pm 2.04	8.24 \pm 0.66	0.336	7.93 \pm 0.67	9.16 \pm 0.64	0.202	10.66 \pm 0.69	10.43 \pm 0.69	0.820	10.58 \pm 1.28	9.96 \pm 0.89	0.688
Leu	0.25 \pm 0.02	0.28 \pm 0.02	0.431	0.28 \pm 0.02	0.32 \pm 0.03	0.387	0.27 \pm 0.02	0.27 \pm 0.01	0.789	0.25 \pm 0.01	0.28 \pm 0.02	0.278
NAA	4.1 \pm 0.27	3.82 \pm 0.14	0.469	3.9 \pm 0.21	3.6 \pm 0.21	0.323	4.5 \pm 0.13	4.46 \pm 0.23	0.883	4.11 \pm 0.62	3.72 \pm 0.25	0.538
NAAG	0.98 \pm 0.06	0.81 \pm 0.01	0.074	0.91 \pm 0.06	0.82 \pm 0.04	0.229	1.05 \pm 0.13	0.89 \pm 0.08	0.322	0.89 \pm 0.1	0.76 \pm 0.05	0.211
Pcho	0.62 \pm 0.06	0.47 \pm 0.04	0.060	0.58 \pm 0.03	0.52 \pm 0.04	0.214	0.66 \pm 0.03	0.54 \pm 0.01	0.006	0.57 \pm 0.09	0.46 \pm 0.02	0.173
Phe	0.63 \pm 0.08	0.39 \pm 0.05	0.041	0.49 \pm 0.03	0.6 \pm 0.11	0.363	0.53 \pm 0.07	0.5 \pm 0.08	0.756	0.57 \pm 0.11	0.7 \pm 0.08	0.371
Tau	3.71 \pm 0.22	3.22 \pm 0.17	0.134	2.81 \pm 0.11	3.07 \pm 0.13	0.150	3.42 \pm 0.29	3.24 \pm 0.13	0.603	2.57 \pm 0.38	3.5 \pm 0.28	0.070

TALLO CEREBRAL

Tabla 16. Datos del estudio de metabolómica: Médula espinal región cervical

Metabolito ($\mu\text{mol}/\text{g}$ tejido)	MÉDULA ESPINAL - REGIÓN CERVICAL											
	4 semanas			8 semanas			12 semanas			16 semanas		
	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.
Ala	0.34 \pm 0.07	0.27 \pm 0.08	0.580	0.25 \pm 0.02	0.33 \pm 0.03	0.057	0.24 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03	0.547	0.26 \pm 0.03	0.36 \pm 0.03	0.028
Asp	2.22 \pm 0.38	1.42 \pm 0.29	0.128	2 \pm 0.14	2.29 \pm 0.22	0.256	1.68 \pm 0.21	2.35 \pm 0.24	0.052	2.18 \pm 0.24	1.83 \pm 0.09	0.111
Bet	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.911	0.06 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.139	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0	0.257	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.298
Cho	0.86 \pm 0.12	0.67 \pm 0.12	0.269	0.66 \pm 0.06	0.74 \pm 0.09	0.424	0.75 \pm 0.14	0.73 \pm 0.13	0.910	0.85 \pm 0.05	0.53 \pm 0.06	0.007
Cr+PCr	3.37 \pm 0.6	2.54 \pm 0.46	0.297	2.99 \pm 0.26	3.57 \pm 0.24	0.127	3.28 \pm 0.3	3.6 \pm 0.27	0.449	3.68 \pm 0.24	3.37 \pm 0.17	0.315
GABA	0.83 \pm 0.16	0.86 \pm 0.16	0.888	0.87 \pm 0.07	0.99 \pm 0.06	0.196	0.93 \pm 0.13	0.93 \pm 0.1	0.987	1.03 \pm 0.02	0.92 \pm 0.06	0.275
Glc	0.65 \pm 0.14	0.55 \pm 0.13	0.628	0.48 \pm 0.08	0.82 \pm 0.15	0.056	0.55 \pm 0.13	0.76 \pm 0.18	0.350	0.49 \pm 0.1	0.62 \pm 0.09	0.401
Gln	1.84 \pm 0.4	1.19 \pm 0.25	0.198	1.58 \pm 0.17	2.01 \pm 0.14	0.072	1.6 \pm 0.2	1.91 \pm 0.21	0.301	1.92 \pm 0.01	1.93 \pm 0.13	0.987
Glu	2.31 \pm 0.43	2.02 \pm 0.38	0.624	2.69 \pm 0.25	3.13 \pm 0.22	0.204	2.7 \pm 0.32	2.95 \pm 0.24	0.555	2.84 \pm 0.12	2.83 \pm 0.14	0.966
Gly	0.55 \pm 0.08	0.41 \pm 0.07	0.221	0.53 \pm 0.04	0.64 \pm 0.04	0.107	0.46 \pm 0.08	0.57 \pm 0.05	0.228	0.61 \pm 0.03	0.57 \pm 0.03	0.417
GPC	0.41 \pm 0.1	0.42 \pm 0.08	0.925	0.54 \pm 0.06	0.63 \pm 0.06	0.295	0.53 \pm 0.07	0.49 \pm 0.03	0.662	0.51 \pm 0.04	0.56 \pm 0.03	0.360
GSH	0.41 \pm 0.08	0.29 \pm 0.08	0.308	0.42 \pm 0.05	0.54 \pm 0.05	0.099	0.37 \pm 0.04	0.45 \pm 0.03	0.117	0.39 \pm 0.02	0.45 \pm 0.05	0.414
Thr	0.56 \pm 0.11	0.5 \pm 0.06	0.667	0.6 \pm 0.1	0.72 \pm 0.09	0.358	0.61 \pm 0.1	0.65 \pm 0.08	0.803	0.38 \pm 0.02	0.73 \pm 0.1	0.052
Lac	5.87 \pm 1.26	4.79 \pm 1.04	0.521	5.55 \pm 0.65	6.84 \pm 0.56	0.158	5.31 \pm 0.59	6.27 \pm 0.87	0.364	6.56 \pm 0.31	6.56 \pm 0.33	0.995
Leu	0.21 \pm 0.03	0.16 \pm 0.03	0.293	0.21 \pm 0.01	0.27 \pm 0.02	0.027	0.2 \pm 0.02	0.18 \pm 0.03	0.692	0.22 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01	0.614
NAA	0.96 \pm 0.36	1.3 \pm 0.25	0.451	1.96 \pm 0.22	2.3 \pm 0.22	0.299	2.18 \pm 0.21	2.45 \pm 0.3	0.473	2.29 \pm 0.15	2.19 \pm 0.14	0.686
NAAG	0.64 \pm 0.11	0.49 \pm 0.08	0.292	0.71 \pm 0.05	0.8 \pm 0.05	0.232	0.84 \pm 0.09	0.83 \pm 0.08	0.952	0.88 \pm 0.04	0.68 \pm 0.04	0.011
Pcho	0.21 \pm 0.05	0.18 \pm 0.03	0.700	0.24 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02	0.770	0.27 \pm 0.03	0.26 \pm 0.03	0.962	0.32 \pm 0.03	0.21 \pm 0.02	0.002
Phe	0.25 \pm 0.02	0.14 \pm 0.04	0.043	0.26 \pm 0.1	0.33 \pm 0.1	0.627	0.04 \pm 0.02	0.27 \pm 0.07	0.010	0.21 \pm 0.04	0.18 \pm 0.05	0.702
Tau	1.18 \pm 0.22	1.15 \pm 0.26	0.919	1.06 \pm 0.12	1.34 \pm 0.11	0.106	1.16 \pm 0.12	1.4 \pm 0.19	0.294	1.52 \pm 0.02	1.21 \pm 0.09	0.079

Tabla 17. Datos del estudio de metabolómica: Médula espinal región dorsal

Metabolito ($\mu\text{mol/g}$ tejido)	4 semanas			8 semanas			12 semanas			16 semanas		
	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.
Ala	0.31 \pm 0.03	0.43 \pm 0.1	0.337	0.28 \pm 0.03	0.6 \pm 0.22	0.087	0.23 \pm 0.03	0.26 \pm 0.02	0.557	0.25 \pm 0.04	0.41 \pm 0.05	0.029
Asp	1.68 \pm 0.23	2.29 \pm 0.41	0.258	2.28 \pm 0.26	3.13 \pm 0.48	0.118	2.15 \pm 0.33	2.36 \pm 0.25	0.672	1.63 \pm 0.21	2.24 \pm 0.26	0.100
Bet	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.647	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.620	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.373	0.06 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.229
Cho	0.75 \pm 0.07	1.44 \pm 0.27	0.080	0.8 \pm 0.09	1.05 \pm 0.16	0.186	0.76 \pm 0.05	0.79 \pm 0.11	0.737	0.68 \pm 0.19	0.88 \pm 0.09	0.362
Cr+Pcr	3.44 \pm 0.52	4.03 \pm 0.43	0.402	3.39 \pm 0.26	4.18 \pm 0.35	0.105	3.36 \pm 0.51	3.82 \pm 0.71	0.602	4.02 \pm 0.79	4.13 \pm 0.54	0.908
GABA	0.94 \pm 0.11	1.19 \pm 0.16	0.248	1.05 \pm 0.11	1.4 \pm 0.26	0.170	1.07 \pm 0.09	0.99 \pm 0.08	0.583	0.76 \pm 0.01	1.17 \pm 0.18	0.108
Glc	0.47 \pm 0.01	0.38 \pm 0.08	0.435	0.46 \pm 0.08	0.91 \pm 0.42	0.197	0.43 \pm 0.12	0.68 \pm 0.29	0.361	0.16 \pm 0.04	0.59 \pm 0.1	0.003
Gln	1.92 \pm 0.36	2.12 \pm 0.28	0.660	1.76 \pm 0.13	2.21 \pm 0.33	0.183	1.77 \pm 0.31	2.37 \pm 0.44	0.293	2.1 \pm 0.47	2.23 \pm 0.36	0.831
Glu	2.36 \pm 0.23	2.96 \pm 0.3	0.154	3.04 \pm 0.29	3.54 \pm 0.33	0.300	2.68 \pm 0.34	2.83 \pm 0.46	0.800	2.58 \pm 0.39	3.31 \pm 0.39	0.211
Gly	0.56 \pm 0.08	0.68 \pm 0.07	0.307	0.51 \pm 0.1	0.76 \pm 0.08	0.105	0.58 \pm 0.08	0.64 \pm 0.08	0.644	0.61 \pm 0.13	0.61 \pm 0.08	0.993
GPC	0.53 \pm 0.09	0.6 \pm 0.11	0.632	0.66 \pm 0.09	0.63 \pm 0.21	0.880	0.62 \pm 0.09	0.64 \pm 0.17	0.933	0.57 \pm 0.11	0.62 \pm 0.11	0.727
GSH	0.46 \pm 0.07	0.55 \pm 0.06	0.341	0.4 \pm 0.03	0.48 \pm 0.06	0.172	0.38 \pm 0.05	0.49 \pm 0.15	0.436	0.55 \pm 0.11	0.49 \pm 0.11	0.726
Thr	0.53 \pm 0.06	0.63 \pm 0.08	0.374	0.77 \pm 0.21	0.73 \pm 0.22	0.902	0.55 \pm 0.08	0.67 \pm 0.14	0.460	0.88 \pm 0.19	0.78 \pm 0.16	0.715
Lac	6.24 \pm 0.66	7.9 \pm 0.89	0.183	7.56 \pm 0.66	7.92 \pm 0.93	0.753	6.82 \pm 1.03	7.38 \pm 1.31	0.745	7.93 \pm 1.59	8.72 \pm 1.36	0.711
Leu	0.23 \pm 0.03	0.26 \pm 0.05	0.717	0.22 \pm 0.03	0.49 \pm 0.25	0.183	0.18 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02	0.128	0.18 \pm 0.01	0.29 \pm 0.03	0.007
NAA	1.48 \pm 0.34	1.95 \pm 0.4	0.408	2.43 \pm 0.42	1.98 \pm 0.73	0.575	2.38 \pm 0.33	2.53 \pm 0.73	0.839	2.38 \pm 0.56	1.95 \pm 0.46	0.564
NAAG	0.72 \pm 0.11	0.73 \pm 0.06	0.914	0.73 \pm 0.02	0.73 \pm 0.05	0.988	0.77 \pm 0.08	0.7 \pm 0.13	0.611	0.88 \pm 0.17	0.73 \pm 0.11	0.479
Pcho	0.26 \pm 0.04	0.27 \pm 0.03	0.792	0.3 \pm 0.04	0.31 \pm 0.05	0.777	0.26 \pm 0.04	0.26 \pm 0.03	0.994	0.25 \pm 0.04	0.26 \pm 0.03	0.763
Phe	0.11 \pm 0.05	0.24 \pm 0.09	0.226	0.16 \pm 0.04	0.5 \pm 0.29	0.162	0.18 \pm 0.05	0.25 \pm 0.07	0.390	0.34 \pm 0.08	0.31 \pm 0.12	0.849
Tau	1.23 \pm 0.18	1.84 \pm 0.18	0.042	1.6 \pm 0.2	2.05 \pm 0.21	0.185	1.48 \pm 0.17	1.78 \pm 0.35	0.399	1.51 \pm 0.34	1.97 \pm 0.24	0.294

Tabla 18. Datos del estudio de metabolómica: Médula espinal región lumbar

Metabolito ($\mu\text{mol/g}$ tejido)	MÉDULA ESPINAL - REGIÓN LUMBAR											
	4 semanas			8 semanas			12 semanas			16 semanas		
	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.	Wild-type Media \pm SE	SOD1 ^{G93A} Media \pm SE	Sig.
Ala	0.28 \pm 0.05	0.42 \pm 0.08	0.151	0.2 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03	0.184	0.27 \pm 0.02	0.26 \pm 0	0.838	0.21 \pm 0.02	0.29 \pm 0.07	0.229
Asp	1.66 \pm 0.46	2.37 \pm 0.57	0.355	1.45 \pm 0.26	2.1 \pm 0.31	0.134	2.17 \pm 0.16	2.49 \pm 0.2	0.243	1.33 \pm 0.15	0.93 \pm 0.13	0.095
Bet	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.893	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0	0.126	0.07 \pm 0	0.05 \pm 0.01	0.043	0.06 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.425
Cho	0.74 \pm 0.18	1.09 \pm 0.15	0.151	0.5 \pm 0.05	0.68 \pm 0.07	0.069	0.74 \pm 0.11	0.88 \pm 0.15	0.478	0.7 \pm 0.09	0.59 \pm 0.16	0.558
Cr+PCr	3.03 \pm 0.56	3.64 \pm 0.41	0.400	2.65 \pm 0.25	3.37 \pm 0.24	0.061	4.28 \pm 0.06	3.63 \pm 0.34	0.096	3.19 \pm 0.52	2.77 \pm 0.49	0.573
GABA	0.83 \pm 0.17	1.17 \pm 0.14	0.162	0.72 \pm 0.04	1.02 \pm 0.12	0.035	1.01 \pm 0.04	0.96 \pm 0.07	0.534	0.78 \pm 0.07	0.65 \pm 0.04	0.181
Glc	0.51 \pm 0.12	0.63 \pm 0.16	0.563	0.36 \pm 0.11	0.57 \pm 0.1	0.203	0.63 \pm 0.16	0.82 \pm 0.18	0.458	0.36 \pm 0.03	0.33 \pm 0.19	0.894
Gln	1.58 \pm 0.34	1.81 \pm 0.28	0.603	1.42 \pm 0.14	1.86 \pm 0.17	0.075	2.35 \pm 0.12	2.15 \pm 0.26	0.455	1.74 \pm 0.34	1.56 \pm 0.35	0.720
Glu	2.33 \pm 0.44	2.88 \pm 0.37	0.359	2.21 \pm 0.23	2.84 \pm 0.25	0.087	2.91 \pm 0.16	2.81 \pm 0.2	0.699	2.34 \pm 0.29	2.15 \pm 0.33	0.664
Gly	0.51 \pm 0.11	0.64 \pm 0.09	0.358	0.41 \pm 0.05	0.53 \pm 0.04	0.094	0.6 \pm 0.02	0.55 \pm 0.04	0.325	0.46 \pm 0.07	0.36 \pm 0.07	0.313
GPC	0.52 \pm 0.08	0.5 \pm 0.07	0.861	0.49 \pm 0.02	0.58 \pm 0.05	0.091	0.73 \pm 0.04	0.48 \pm 0.04	0.002	0.49 \pm 0.06	0.36 \pm 0.08	0.228
GSH	0.39 \pm 0.07	0.51 \pm 0.06	0.239	0.32 \pm 0.03	0.4 \pm 0.03	0.081	0.53 \pm 0.01	0.48 \pm 0.04	0.255	0.32 \pm 0.07	0.36 \pm 0.1	0.722
Thr	0.55 \pm 0.08	0.67 \pm 0.17	0.525	0.45 \pm 0.06	0.65 \pm 0.02	0.020	0.77 \pm 0.13	0.63 \pm 0.04	0.373	0.62 \pm 0.11	1.5 \pm 0.82	0.272
Lac	6.41 \pm 1.3	7.49 \pm 0.77	0.493	5.12 \pm 0.62	6.81 \pm 0.76	0.109	6.6 \pm 0.37	5.86 \pm 0.65	0.331	5.58 \pm 0.89	3.09 \pm 1.17	0.118
Leu	0.2 \pm 0.03	0.28 \pm 0.05	0.148	0.17 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02	0.250	0.19 \pm 0.02	0.2 \pm 0.02	0.624	0.18 \pm 0.02	0.22 \pm 0.06	0.416
NAA	1.82 \pm 0.35	1.84 \pm 0.35	0.969	1.74 \pm 0.14	2.1 \pm 0.14	0.092	2.55 \pm 0.35	1.95 \pm 0.19	0.188	2.06 \pm 0.36	1.02 \pm 0.16	0.035
NAAG	0.53 \pm 0.1	0.58 \pm 0.05	0.725	0.71 \pm 0.06	0.76 \pm 0.07	0.545	1.02 \pm 0.04	0.84 \pm 0.1	0.110	0.8 \pm 0.06	0.47 \pm 0.02	0.003
Pcho	0.22 \pm 0.05	0.24 \pm 0.03	0.694	0.23 \pm 0.03	0.25 \pm 0.04	0.780	0.33 \pm 0.02	0.24 \pm 0.03	0.034	0.25 \pm 0.02	0.18 \pm 0.03	0.131
Phe	0.19 \pm 0.05	0.26 \pm 0.13	0.624	0.13 \pm 0.05	0.14 \pm 0.07	0.895	0.11 \pm 0.04	0.17 \pm 0.05	0.417	0.06 \pm 0.03	0.15 \pm 0.1	0.379
Tau	1.22 \pm 0.22	1.89 \pm 0.15	0.033	0.91 \pm 0.01	1.35 \pm 0.17	0.046	1.38 \pm 0.06	1.33 \pm 0.11	0.703	0.89 \pm 0.1	1.08 \pm 0.19	0.397

REFERENCIAS



REFERENCIAS

- Abad, C. et al., 2003. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 124(4), pp.961–71.
- Abad, C. et al., 2010. Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), pp.19555–60.
- Abad, C. et al., 2015. Vasoactive intestinal peptide-deficient mice exhibit reduced pathology in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Neuroimmunomodulation*, 22(3), pp.203–12.
- Abad, C. et al., 2012. VIP deficient mice exhibit resistance to lipopolysaccharide induced endotoxemia with an intrinsic defect in proinflammatory cellular responses. *PLoS One*, 7(5), p.e36922.
- Abad, C. & Waschek, J.A., 2011. Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis. *Current pharmaceutical design*, 17(10), pp.1025–35.
- Abe, K. et al., 2001. Decrease in N-acetylaspartate/creatine ratio in the motor area and the frontal lobe in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroradiology*, 43(7), pp.537–4
- Absood, A., Chen, D. & Håkanson, R., 1992. Neuropeptides of the vasoactive intestinal peptide/helodermin/pituitary adenylate cyclase activating peptide family elevate plasma cAMP in mice: comparison with a range of other regulatory peptides. *Regulatory peptides*, 40(3), pp.311–22.
- Adams CW, Poston RN, B.S., 1989. Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. - PubMed - NCBI. *J Neurol Sci*, pp.92(2–3):291–306.

- Aebischer, J. et al., 2012. Elevated levels of IFN γ and LIGHT in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *European journal of neurology*, 19(5), pp.752–9, e45–6.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), pp.783–801.
- Alexander, G.M. et al., 2004. Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Brain Res Mol Brain Res*, 130(1-2), pp.7–15.
- Alexopoulou, L. et al., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), pp.732–738.
- Alliot, F., Godin, I. & Pessac, B., 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Developmental Brain Research*, 117(2), pp.145–152.
- Aloisi, F., 2001. Immune function of microglia. *Glia*, 36(2), pp.165–179.
- Alter, A. et al., 2003. Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170, pp.4497–4505.
- Amor, S. et al., 2014. Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. *Immunology*, 142(2), pp.151–166.
- Amor, S. et al., 2010. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, 129(2), pp.154–69.
- Andersen, O. et al., 1984. VIP in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Peptides*, 5(2), pp.435–7.
- Andreassen, O.A. et al., 2001. Increases in cortical glutamate concentrations in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice are attenuated by creatine supplementation. *J Neurochem*, 77(2), pp.383–390.

- Angenstein, F. et al., 2004. Age-dependent changes in MRI of motor brain stem nuclei in a mouse model of ALS. *Neuroreport*, 15(14), pp.2271–4.
- Antel, J.P. & Owens, T., 1999. Immune regulation and CNS autoimmune disease. *Journal of neuroimmunology*, 100(1-2), pp.181–9.
- Appel, S.H. et al., 1995. Autoimmunity as an etiological factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Advances in neurology*, 68, pp.47–57.
- Arai, T. et al., 2006. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 351(3), pp.602–11.
- Armstrong, B.D. et al., 2003. Lymphocyte regulation of neuropeptide gene expression after neuronal injury. *Journal of neuroscience research*, 74(2), pp.240–7. A
- Arun, P., Moffett, J.R. & Namboodiri, A.M., 2010. Riluzole decreases synthesis of N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res*, 1334, pp.25–30.
- Ashur-Fabian, O. et al., 2003. The neuroprotective peptide NAP inhibits the aggregation of the beta-amyloid peptide. *Peptides*, 24(9), pp.1413–23.
- Aton, S.J. et al., 2005. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature neuroscience*, 8(4), pp.476–83.
- Avidan, H. et al., 2004. Vaccination with autoantigen protects against aggregated beta-amyloid and glutamate toxicity by controlling microglia: effect of CD4+CD25+ T cells. *European journal of immunology*, 34(12), pp.3434–45.
- Banerjee, R. et al., 2008. Adaptive immune neuroprotection in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *PLoS One*, 3(7), p.e2740.

- Barber, S.C. & Shaw, P.J., 2010. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free radical biology & medicine*, 48(5), pp.629–41.
- Baron, R. et al., 2008. IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(8), pp.2843–52.
- Bassan, M. et al., 1999. Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *Journal of neurochemistry*, 72(3), pp.1283–93.
- Bauer, S., Müller, T. & Hamm, S., 2009. Pattern recognition by Toll-like receptors. *Advances in experimental medicine and biology*, 653, pp.15–34.
- Beers, D.R. et al., 2011. Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(5), pp.1025–1035.
- Belbasis, L., Bellou, V. & Evangelou, E., 2016. Environmental Risk Factors and Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Umbrella Review and Critical Assessment of Current Evidence from Systematic Reviews and Meta-Analyses of Observational Studies. *Neuroepidemiology*, 46(2), pp.96–105.
- Beni-Adani, L. et al., 2001. A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates injury response in closed head injury in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 296(1), pp.57–63.
- Benimetskaya, L. et al., 1997. Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein. *Nature medicine*, 3(4), pp.414–20.
- Bento-Abreu, A. et al., 2010. The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis. *The European journal of neuroscience*, 31(12), pp.2247–65.

- Le Ber, I. et al., 2014. hnRNPA2B1 and hnRNPA1 mutations are rare in patients with “multisystem proteinopathy” and frontotemporal lobar degeneration phenotypes. *Neurobiology of aging*, 35(4), pp.934.e5–6.
- Bianchi, M.E. & Manfredi, A.A., 2009. Immunology. Dangers in and out. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5922), pp.1683–4.
- Blasco, H. et al., 2010. 1H-NMR-Based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 5(10).
- Blasco, H. et al., 2014. Untargeted 1H-NMR metabolomics in CSF: Toward a diagnostic biomarker for motor neuron disease. *Neurology*, 82(13), pp.1167–1174.
- Block, W. et al., 1998. Proton magnetic resonance spectroscopy of the primary motor cortex in patients with motor neuron disease: subgroup analysis and follow-up measurements. *Archives of neurology*, 55(7), pp.931–6.
- Blondel, O. et al., 2000. A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(21), pp.8012–8020.
- Bloom, S.R. et al., 1983. Diarrhoea in vipoma patients associated with cosecretion of a second active peptide (peptide histidine isoleucine) explained by single coding gene. *Lancet (London, England)*, 2(8360), pp.1163–5.
- Boillée, S., Yamanaka, K., et al., 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5778), pp.1389–1392.
- Boillée, S., Peschanski, M. & Junier, M., 2003. The wobbler mouse. *Molecular neurobiology*, 28(1), pp.65–106.
- Boillée, S., Vande Velde, C. & Cleveland, D., 2006. ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron*, 52(1), pp.39–59.
- Boissonneault, V. et al., 2008. Powerful beneficial effects of macrophage

colony-stimulating factor on α -amyloid deposition and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain*, 132(4), pp.1078–1092.

Borchelt, D.R. et al., 1994. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(17), pp.8292–6.

Van Den Bosch, L., 2011. Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, p.348765.

Braithwaite, M. et al., 2009. Expression of activity-dependent neuroprotective protein in the immune system: possible functions and relevance to multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation*, 17(2), pp.120–125.

Brenneman, D.E. et al., 1998. Activity-dependent neurotrophic factor: structure-activity relationships of femtomolar-acting peptides. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 285(2), pp.619–27.

Brenneman, D.E. et al., 1997. Identity of neurotrophic molecules released from astroglia by vasoactive intestinal peptide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 814, pp.167–73.

Brenneman, D.E. et al., 2004. Protective peptides that are orally active and mechanistically nonchiral. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 309(3), pp.1190–7.

Brenneman, D.E. et al., 1990. Vasoactive intestinal peptide: a neurotrophic releasing agent and an astroglial mitogen. *Journal of neuroscience research*, 25(3), pp.386–94.

Brenneman, D.E. & Eiden, L.E., 1986. Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(4), pp.1159–1162.

- Brenneman, D.E., Eiden, L.E. & Siegel, R.E., 1985. Neurotrophic action of VIP on spinal cord cultures. *Peptides*, 6 Suppl 2, pp.35–9.
- Brenneman, D.E. & Gozes, I., 1996. A femtomolar-acting neuroprotective peptide. *The Journal of clinical investigation*, 97(10), pp.2299–307.
- Brenneman, D.E., Spong, C.Y. & Gozes, I., 2000. Protective peptides derived from novel glial proteins. *Biochemical Society transactions*, 28(4), pp.452–5.
- Brettschneider, J. et al., 2012. Microglial activation correlates with disease progression and upper motor neuron clinical symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS one*, 7(6), p.e39216.
- Brites, D. & Vaz, A.R., 2014. Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(May), p.117.
- Brooks, B.R. et al., 2000. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders : official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, 1(5), pp.293–9.
- Brown, I.R., 2007. Heat shock proteins and protection of the nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113, pp.147–58.
- Brown, T.M. et al., 2007. Disrupted neuronal activity rhythms in the suprachiasmatic nuclei of vasoactive intestinal polypeptide-deficient mice. *Journal of neurophysiology*, 97(3), pp.2553–8.
- Brujin, L.I. et al., 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, 18(2), pp.327–38.
- Brujin, L.I., Miller, T.M. & Cleveland, D.W., 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annual review of neuroscience*, 27, pp.723–49.

- Bsibsi, M. et al., 2002. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 61(11), pp.1013–21.
- Burbach, J.P.H., 2011. What are neuropeptides? *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 789, pp.1–36.
- Caballero-Hernandez, D. et al., 2015. The “Omics” of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Trends in Molecular Medicine*, 22(1), pp.53–67.
- Camacho, A., Esteban, J. & Paradas, C., 2015. Report by the Spanish Foundation for the Brain on the social impact of amyotrophic lateral sclerosis and other neuromuscular disorders. *Neurologia (Barcelona, Spain)*.
- Campbell, A., 2004. Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1035, pp.117–32.
- Carew, J.D., Nair, G., Pineda-Alonso, N., et al., 2011. Magnetic resonance spectroscopy of the cervical cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*, 12(3), pp.185–191.
- Carew, J.D., Nair, G., Andersen, P.M., et al., 2011. Presymptomatic spinal cord neurometabolic findings in SOD1-positive people at risk for familial ALS. *Neurology*, 77(14), pp.1370–1375.
- Carson, M.J. et al., 2006. CNS immune privilege: Hiding in plain sight. *Immunological Reviews*, 213(1), pp.48–65.
- de Carvalho, M. et al., 2008. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 119(3), pp.497–503.
- Casula, M. et al., 2011. Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Neuroscience*, 179, pp.233–243.

- Cazillis, M. et al., 2004. VIP and PACAP induce selective neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Eur J Neurosci*, 19(4), pp.798–808.
- Charcot, J.-M. & Joffroy, A., 1869. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Arch Physiol Neurol*, pp.2:744–754.
- Cheah, B.C. et al., 2010. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Current medicinal chemistry*, 17(18), pp.1942–199.
- Chen, W.-H. & Tzeng, S.-F., 2005. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cell death in the spinal cord with traumatic injury. *Neuroscience letters*, 384(1-2), pp.117–21.
- Chen, W.Q. et al., 2001. Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *Journal of neuroscience research*, 66(4), pp.612–9.
- Chew, J. et al., 2015. Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6239), pp.1151–4.
- De Chiara, G. et al., 2012. Infectious Agents and Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 46(3), pp.614–638.
- Chiu, A.Y. et al., 1995. Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular and cellular neurosciences*, 6(4), pp.349–62.
- Chiu, I.M. et al., 2008. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(46), pp.17913–17918.
- Choi, J.K. et al., 2009a. Magnetic resonance spectroscopy of regional brain metabolite markers in FALS mice and the effects of dietary creatine supplementation. *Eur J Neurosci*, 30(11), pp.2143–2150.
- Chung, Y.H. et al., 2003. Immunohistochemical study on the distribution of

- MnSOD in the central nervous system of the transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation. *Brain research*, 990(1-2), pp.215–20.
- Cistaro, A. et al., 2014. The metabolic signature of C9ORF72-related ALS: FDG PET comparison with nonmutated patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 41(5), pp.844–852.
- Cobo, M. et al., 2013. Mesenchymal stem cells expressing vasoactive intestinal peptide ameliorate symptoms in a model of chronic multiple sclerosis. *Cell transplantation*, 22(5), pp.839–54.
- Colwell, C.S. et al., 2003. Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 285(5), pp.R939–49.
- Colwell, C.S., 2004. Selective deficits in the circadian light response in mice lacking PACAP. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(5), pp.R1194–R1201.
- Cooke, F.J. et al., 2004. Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the cervical spinal cord. *Magnetic resonance in medicine*, 51(6), pp.1122–8.
- Correale, J. & Villa, A., 2004. The neuroprotective role of inflammation in nervous system Injuries. *Journal of Neurology*, 251(11), pp.1304–1316.
- Correale, J., Villa, A.M. & Garcea, O., 2011. *Neuroinmunología clínica*, Buenos Aires - Argentina.
- Cutler, D.J. et al., 2003. The mouse VPAC2 receptor confers suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity and responsiveness to vasoactive intestinal polypeptide in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 17(2), pp.197–204.
- Cutz E, Chan W, Track NS, Goth A, S.S., 1978. Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators. - PubMed - NCBI. *Nature*, 275, pp.661–662.

- Cwik, V.A. et al., 1998. Estimation of brainstem neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis with in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Neurology*, 50(1), pp.72–77.
- Danek, A. et al., 1983. Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on nonadherent peripheral blood lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 131(3), pp.1173–7.
- Danielsson, E. et al., 1988. VIP-sensitive adenylate cyclase, guanylate cyclase, muscarinic receptors, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase, in brain tissue afflicted by Alzheimer's disease/senile dementia of the Alzheimer type. *Neurobiology of aging*, 9(2), pp.153–62.
- Van Deerlin, V.M. et al., 2008. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *The Lancet. Neurology*, 7(5), pp.409–16.
- Dejda, A., Sokołowska, P. & Nowak, J.Z., 2005. Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacological reports : PR*, 57(3), pp.307–20.
- DeJesus-Hernandez, M. et al., 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), pp.245–256.
- Delgado, M. et al., 2002. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 80(1), pp.16–24.
- Delgado, M. & Ganea, D., 2001. Cutting edge: is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine? *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(5), pp.2907–12.
- Delgado, M. & Ganea, D., 2003. Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. *FASEB journal :*

official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 17(13), pp.1922–4.

Delgado, M., Pozo, D. & Ganea, D., 2004. The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in. *In Vivo*, 56(2), pp.249–290.

Delgado, M., Varela, N. & Gonzalez-Rey, E., 2008. Vasoactive intestinal peptide protects against beta-amyloid-induced neurodegeneration by inhibiting microglia activation at multiple levels. *Glia*, 56(10), pp.1091–103.

Deng, H.X. et al., 2011. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, 477(7363), pp.211–215.

Deng, H.-X. et al., 2012. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, 477(7363), pp.211–215.

Derave, W. et al., 2003. Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. *Neurobiol Dis*, 13(3), pp.264–272.

Deverman, B.E. & Patterson, P.H., 2009. Cytokines and CNS Development. *Neuron*, 64(1), pp.61–78.

Dickson, L. & Finlayson, K., 2009. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(3), pp.294–316.

Dittel, B.N., Urbania, T.H. & Janeway, C.A., 2000. Relapsing and remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in B cell deficient mice. *Journal of autoimmunity*, 14(4), pp.311–8.

Dogrukol-Ak, D., Tore, F. & Tuncel, N., 2004. Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects. *Current pharmaceutical design*, 10(12), pp.1325–40.

Drouin-Ouellet, J. & Cicchetti, F., 2012. Inflammation and neurodegeneration: The story “retolled.” *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(10), pp.542–

551.

- Duchen, L.W. & Strich, S.J., 1968. An hereditary motor neurone disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant "wobbler". *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 31(6), pp.535–42.
- Duffy, L.M. et al., 2011. Review: The role of mitochondria in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology*, 37(4), pp.336–52.
- Dupuis, L. et al., 2004. Mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis: a trigger and a target. *Neuro-degenerative diseases*, 1(6), pp.245–54.
- Ebert, S. et al., 2010. Recurrent systemic infections with *Streptococcus pneumoniae* do not aggravate the course of experimental neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroscience Research*, 88(5), pp.1124–1136.
- Elliott, J.L., 2001. Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research. Molecular brain research*, 95(1-2), pp.172–8.
- Evans, M.C. et al., 2013. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 53, pp.34–41.
- Fernandez-Martin, A. et al., 2006. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 36(2), pp.318–326.
- Ferraiuolo, L. et al., 2011. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, 7(11), pp.616–30.
- Fuxe, K. et al., 1977. Vasoactive intestinal polypeptide and the nervous system: immunohistochemical evidence for localization in central and peripheral

neurons, particularly intracortical neurons of the cerebral cortex. *Neuroscience letters*, 5(5), pp.241–6.

Ganea, D., 1996. Regulatory effects of vasoactive intestinal peptide on cytokine production in central and peripheral lymphoid organs. *Advances in neuroimmunology*, 6(1), pp.61–74.

Ganesalingam, J. & Bowser, R., 2010. The application of biomarkers in clinical trials for motor neuron disease. *Biomarkers in Medicine*, 4(2), pp.281–297.

Gelman, A.E. et al., 2004. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(10), pp.6065–73.

Georg, B., Hannibal, J. & Fahrenkrug, J., 2007. Lack of the PAC1 receptor alters the circadian expression of VIP mRNA in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Brain research*, 1135(1), pp.52–7.

Ghadge, G.D. et al., 2003. Glutamate carboxypeptidase II inhibition protects motor neurons from death in familial amyotrophic lateral sclerosis models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), pp.9554–9.

Gitcho, M.A. et al., 2008. TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Annals of neurology*, 63(4), pp.535–8.

Glass, C.K. et al., 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), pp.918–934.

Gomariz, R.P. et al., 1994. Vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA expression in rat T and B lymphocytes. *Regul Pept*, 50(2), pp.177–184.

González Deniselle, M.C., González, S.L. & De Nicola, a F., 2001. Cellular basis of steroid neuroprotection in the wobbler mouse, a genetic model of motoneuron disease. *Cellular and molecular neurobiology*, 21(3), pp.237–54.

- Gonzalez-Rey, E. et al., 2006. Therapeutic Effect of Vasoactive Intestinal Peptide on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The American Journal of Pathology*, 168(4), pp.1179–1188.
- Gonzalez-Rey, E. et al., 2005. Vasoactive intestinal peptide family as a therapeutic target for Parkinson's disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, 9(5), pp.923–9.
- Gonzalez-Rey, E. et al., 2006. Vasoactive intestinal peptide induces CD4+,CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 54(3), pp.864–876.
- Gonzalez-Rey, E., Anderson, P. & Delgado, M., 2007. Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: a new approach for autoimmune therapy. *Annals of the rheumatic diseases*, 66, pp.70–76.
- González-Scarano, F. & Baltuch, G., 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual review of neuroscience*, 22, pp.219–40.
- Gordon, P.H. et al., 2007. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurology*, 6(12), pp.1045–1053.
- Goursaud, S. et al., 2015. The anti-inflammatory peptide stearyl-norleucine-VIP delays disease onset and extends survival in a rat model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 263, pp.91–101.
- Goursaud, S. et al., 2011. The VPAC2 agonist peptide histidine isoleucine (PHI) up-regulates glutamate transport in the corpus callosum of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis (hSOD1G93A) by inhibiting caspase-3 mediated inactivation of GLT-1a. *FASEB J*, 25(10), pp.3674–3686.
- Gowing, G. et al., 2009. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) exacerbates ALS disease in a mouse model through altered responses of microglia expressing mutant superoxide dismutase. *Experimental*

Neurology, 220(2), pp.267–275.

Gozes, I. et al., 2000. A novel VIP responsive gene. Activity dependent neuroprotective protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 921, pp.115–8.

Gozes, I. et al., 1997. Antiserum to activity-dependent neurotrophic factor produces neuronal cell death in CNS cultures: immunological and biological specificity. *Brain research. Developmental brain research*, 99(2), pp.167–75.

Gozes, I. et al., 2003. From vasoactive intestinal peptide (VIP) through activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) to NAP: a view of neuroprotection and cell division. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 20(3), pp.315–322.

Gozes, I. et al., 1993. Learning and sexual deficiencies in transgenic mice carrying a chimeric vasoactive intestinal peptide gene. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 4(3), pp.185–93.

Gozes, I., Morimoto, B.H., et al., 2005. NAP: research and development of a peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP). *CNS drug reviews*, 11(4), pp.353–68.

Gozes, I. et al., 1998. Protection against developmental deficiencies by a lipophilic VIP analogue. *Neurochemical research*, 23(5), pp.689–93.

Gozes, I., Zaltzman, R., et al., 2005. The expression of activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) is regulated by brain damage and treatment of mice with the ADNP derived peptide, NAP, reduces the severity of traumatic head injury. *Current Alzheimer research*, 2(2), pp.149–53.

Gozes, I. et al., 2003. Treatment of experimental encephalomyelitis by intranasal application of the ADNP peptide, NAP. *Abstract Viewer/Itinerary Planner Washington, DC: Society For Neuroscience*,

- p.Program No. 952.1.
- Gozes, I., 2008. VIP, from gene to behavior and back: summarizing my 25 years of research. *Journal of molecular neuroscience*, 36(1-3), pp.115–124.
- Gozes, I. & Brenneman, D.E., 2000. A new concept in the pharmacology of neuroprotection. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 14(1-2), pp.61–68.
- Gozes, I. & Brenneman, D.E., 1996. Activity-dependent neurotrophic factor (ADNF). An extracellular neuroprotective chaperonin? *Journal of molecular neuroscience : MN*, 7(4), pp.235–44.
- Gozes, I. & Divinski, I., 2004. The femtomolar-acting NAP interacts with microtubules: Novel aspects of astrocyte protection. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 6(6 Suppl), pp.S37–41.
- Gozes, I. & Furman, S., 2003. VIP and drug design. *Current pharmaceutical design*, 9(6), pp.483–94.
- Gredal, O. et al., 1997. Quantification of brain metabolites in amyotrophic lateral sclerosis by localized proton magnetic resonance spectroscopy. *Neurology*, 48(4), pp.878–881.
- Gressens, P. et al., 1993. Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature*, 362(6416), pp.155–8.
- Gressens, P. et al., 1994. Severe microcephaly induced by blockade of vasoactive intestinal peptide function in the primitive neuroepithelium of the mouse. *Journal of Clinical Investigation*, 94(5), pp.2020–2027.
- Grupo de trabajo de la Guía Asistencial de Esclerosis Lateral Amiotrófica, 2012. *Guía Asistencial de Esclerosis Lateral Amiotrófica* Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud y Bienestar Social. Junta de Andalucía, ed., Sevilla.

- Guerrero, J.M. et al., 1981. Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 21(2), pp.151–160.
- Gurney, M.E. et al., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166), pp.1772–1775.
- Haenggeli, C. & Kato, A.C., 2002. Differential vulnerability of cranial motoneurons in mouse models with motor neuron degeneration. *Neuroscience letters*, 335(1), pp.39–43.
- Haidet-Phillips, A.M. et al., 2011. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature biotechnology*, 29(9), pp.824–8.
- Ben Hamida, M., Hentati, F. & Ben Hamida, C., 1990. Hereditary motor system diseases (chronic juvenile amyotrophic lateral sclerosis). Conditions combining a bilateral pyramidal syndrome with limb and bulbar amyotrophy. *Brain : a journal of neurology*, 113 (Pt 2, pp.347–63.
- Hamidi, S.A., Prabhakar, S. & Said, S.I., 2008. Enhancement of pulmonary vascular remodelling and inflammatory genes with VIP gene deletion. *The European respiratory journal*, 31(1), pp.135–9.
- Harmar, A.J. et al., 2012. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *British Journal of Pharmacology*, 166(1), pp.4–17.
- Hatzipetros, T. et al., 2014. C57BL/6J congenic Prp-TDP43A315T mice develop progressive neurodegeneration in the myenteric plexus of the colon without exhibiting key features of ALS. *Brain Research*, 1584, pp.59–72.
- Hauser, S.L. et al., 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, 358(7), pp.676–

88.

- Henkel, J.S. et al., 2004. Presence of Dendritic Cells, MCP-1, and Activated Microglia/Macrophages in Amyotrophic Lateral Sclerosis Spinal Cord Tissue. *Annals of Neurology*, 55(2), pp.221–35.
- Henkel, J.S. et al., 2013. Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med*, 5(1), pp.64–79.
- Henkel, J.S. et al., 2006. The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(3), pp.427–437.
- Henning, R.J. & Sawmiller, D.R., 2001. Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovascular research*, 49(1), pp.27–37.
- Hickey, W.F., 2001. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia*, 36(2), pp.118–124.
- Hickey, W.F., 1999. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Seminars in immunology*, 11(2), pp.125–137.
- Higgins, C.M.J. et al., 2002. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(6), p.RC215.
- Hill, J.M. et al., 2002. Vasoactive intestinal peptide regulation of nerve growth factor in the embryonic mouse. *Peptides*, 23(10), pp.1803–8. Available at:
- Ho, Y.S. et al., 1998. Transgenic models for the study of lung antioxidant defense: enhanced manganese-containing superoxide dismutase activity gives partial protection to B6C3 hybrid mice exposed to hyperoxia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 18(4), pp.538–47.
- Hoek, R.M. et al., 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through

- interaction with OX2 (CD200). *Science (New York, N.Y.)*, 290(5497), pp.1768–1771.
- Houi, K. et al., 2002. Increased plasma TGF-beta1 in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica*, 106(5), pp.299–301.
- Huang, C. et al., 2011. FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *PLoS genetics*, 7(3), p.e1002011.
- Hukema, R.K. et al., 2014. A new inducible transgenic mouse model for C9orf72-associated GGGGCC repeat expansion supports a gain-of-function mechanism in C9orf72 associated ALS and FTD. *Acta neuropathologica communications*, 2(1), p.166.
- Huxtable, R.J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiological reviews*, 72(1), pp.101–63.
- Huxtable, R.J., 1989. Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Progress in neurobiology*, 32(6), pp.471–533.
- Ikeda, K. et al., 1998. Quantification of brain metabolites in ALS by localized proton magnetic spectroscopy. *Neurology*, 50(2), pp.576–577.
- Ikeda, K. et al., 2013. Relationship between cervical cord 1H-magnetic resonance spectroscopy and clinico-electromyographic profile in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, 47(1), pp.61–67.
- Ilieva, H., Polymenidou, M. & Cleveland, D.W., 2009. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *Journal of Cell Biology*, 187(6), pp.761–772.
- Iłzecka, J., Stelmasiak, Z. & Dobosz, B., 2002. Transforming growth factor-Beta 1 (tgf-Beta 1) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine*, 20(5), pp.239–43.
- Itoh, N. et al., 1983. Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature*, 304(5926), pp.547–9.

- Iwasaki, A. & Medzhitov, R., 2010. Regulation of adaptative immunity by the innate immune system. *Science*, 327(5963), pp.291–295.
- Jacobsen, J.G. & Smith, L.H., 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiological reviews*, 48(2), pp.424–511.
- Jégou, S. et al., 1988. Regional distribution of vasoactive intestinal peptide in brains from normal and parkinsonian subjects. *Peptides*, 9(4), pp.787–93.
- Jixin Zhong, Jun-Fa Xu, Ping Yang, Y.L. and C.-Y.W., 2011. *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy* D. Wagner, ed., InTech.
- Jones, A.P. et al., 1995. Preliminary results of proton magnetic resonance spectroscopy in motor neurone disease (amyotrophic lateral sclerosis). *J Neurol Sci*, 129 Suppl, pp.85–89.
- Joosten, E.A. et al., 2001. Cellular changes in motoneurons in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis as revealed by monoclonal antibody Py. *Brain research. Developmental brain research*, 131(1-2), pp.153–9.
- Jouroukhin, Y. et al., 2013. NAP (davunetide) modifies disease progression in a mouse model of severe neurodegeneration: protection against impairments in axonal transport. *Neurobiol Dis*, 56, pp.79–94.
- Jouroukhin, Y., Ostritsky, R. & Gozes, I., 2012. D-NAP prophylactic treatment in the SOD mutant mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: review of discovery and treatment of tauopathy. *J Mol Neurosci*, 48(3), pp.597–602.
- Joyce, P.I. et al., 2011. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: Recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mammalian Genome*, 22(7-8), pp.420–448.
- Kabashi, E. et al., 2011. FUS and TARDBP but not SOD1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS genetics*, 7(8), p.e1002214.
- Kabashi, E. et al., 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and

- familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics*, 40(5), pp.572–4.
- Kang, J. & Rivest, S., 2007. MyD88-deficient bone marrow cells accelerate onset and reduce survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of cell biology*, 179(6), pp.1219–1230.
- Kalra, S. et al., 2006. Detection of cerebral degeneration in amyotrophic lateral sclerosis using high-field magnetic resonance spectroscopy. *Archives of neurology*, 63(8), pp.1144–8.
- Kastin, A.J., 2000. What is a neuropeptide? *Trends in Neurosciences*, 23(3), p.113.
- Kato, I. et al., 1994. Transgenic mice overexpressing human vasoactive intestinal peptide (VIP) gene in pancreatic beta cells. Evidence for improved glucose tolerance and enhanced insulin secretion by VIP and PHM-27 in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 269(33), pp.21223–8.
- Kato, S., 2008. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta neuropathologica*, 115(1), pp.97–114.
- Kaur, C. & Ling, E.A., 2008. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Current neurovascular research*, 5(1), pp.71–81.
- Keino, H. et al., 2004. Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by vasoactive intestinal peptide. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 122(8), pp.1179–84.
- Kieran, D. et al., 2005. A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *Journal of Cell Biology*, 169(4), pp.561–567.
- Kiernan, M.C. et al., 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 377(9769), pp.942–55.
- Kim, H.J. et al., 2013. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and

- hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*, 495(7442), pp.467–473.
- Kim, W.K. et al., 2000. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor- α production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(10), pp.3622–3630.
- Klavdieva, M.M., 1995. The History of Neuropeptides I. *Frontiers in neuroendocrinology*, 16, pp.293–321.
- Korkmaz, O.T. et al., 2010. Vasoactive intestinal peptide (VIP) treatment of Parkinsonian rats increases thalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) levels and alters the release of nerve growth factor (NGF) by mast cells. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 41(2), pp.278–87.
- Kuhle, J. et al., 2009. Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology*, 16(6), pp.771–774.
- Kumar, A. et al., 2010. Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 411(7-8), pp.563–567.
- Kurland, L.T. & Mulder, D.W., 1954. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution and special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations. *Neurology*, 4(6), pp.438–48.
- Kwiatkowski, T.J. et al., 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), pp.1205–8.
- De la Fuente, M., Delgado, M. & Gomariz, R.P., 1996. VIP modulation of immune cell functions. *Advances in neuroimmunology*, 6(1), pp.75–91.

- Lacombe, A. et al., 2007. Lack of vasoactive intestinal peptide reduces testosterone levels and reproductive aging in mouse testis. *Journal of Endocrinology*, 194(1), pp.153–160.
- Laskin, D.L. & Pendino, K.J., 1995. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 35, pp.655–77.
- Lawton, K. a et al., 2014. Plasma metabolomic biomarker panel to distinguish patients with amyotrophic lateral sclerosis from disease mimics. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, (November 2013), pp.1–9.
- Lee, J. et al., 2006. Interferon-gamma is up-regulated in the hippocampus in response to intermittent fasting and protects hippocampal neurons against excitotoxicity. *Journal of neuroscience research*, 83(8), pp.1552–7.
- Lee, M.K. et al., 1996. Transgenic models of neurodegenerative diseases. *Current opinion in neurobiology*, 6(5), pp.651–60.
- Lehnardt, S., 2009. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, 263(August 2009), p.NA–NA.
- Lehnardt, S., 2010. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, 58(3), pp.253–263.
- Leitner, M., Menzies, S. & Lutz, C., 2009. *Working with ALS mice: Guidelines for preclinical testing & colony management*,
- Lelievre, V. et al., 2007. Gastrointestinal dysfunction in mice with a targeted mutation in the gene encoding vasoactive intestinal polypeptide: a model for the study of intestinal ileus and Hirschsprung's disease. *Peptides*, 28(9), pp.1688–99.

- Letiembre, M. et al., 2009. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiol Aging*, 30(5), pp.759–768.
- Li, G. et al., 2005. Femtomolar concentrations of dextromethorphan protect mesencephalic dopaminergic neurons from inflammatory damage. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(6), pp.489–96.
- Lim, M.A. et al., 2008. Regardless of genotype, offspring of VIP-deficient female mice exhibit developmental delays and deficits in social behavior. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(5), pp.423–434.
- Lincecum, J.M. et al., 2010. From transcriptome analysis to therapeutic anti-CD40L treatment in the SOD1 model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 42(5), pp.392–399.
- Liu, B. et al., 2001. Femtomolar concentrations of dynorphins protect rat mesencephalic dopaminergic neurons against inflammatory damage. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 298(3), pp.1133–41.
- Liu, G., Zhang, L. & Zhao, Y., 2010. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 160(2), pp.168–175.
- Liu, J., Gao, L. & Zang, D., 2015. Elevated Levels of IFN- γ in CSF and Serum of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Plos One*, 10(9), p.e0136937.
- Liu, S. & Kielian, T., 2009. Microglial activation by *Citrobacter koseri* is mediated by TLR4- and MyD88-dependent pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(9), pp.5537–47.
- Loane, D.J. & Byrnes, K.R., 2010. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(4), pp.366–77.

- Louveau, A., Harris, T.H. & Kipnis, J., 2015. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends in immunology*, 36(10), pp.569–77.
- Loy, C.T. et al., 2010. Very early-onset frontotemporal dementia with no family history predicts underlying fused in sarcoma pathology. *Brain: a journal of neurology*, 133(Pt 12), p.e158; author reply e159.
- Mackenzie, I.R., Rademakers, R. & Neumann, M., 2010. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet. Neurology*, 9(10), pp.995–1007.
- Magistretti, P.J., Cardinaux, J.R. & Martin, J.L., 1998. VIP and PACAP in the CNS: regulators of glial energy metabolism and modulators of glutamatergic signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 865, pp.213–25.
- Malaspina, A., Puentes, F. & Amor, S., 2014. Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective. *Int Immunol*, 27(3), pp.117–129.
- Malishkevich, A. et al., 2015. Activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) exhibits striking sexual dichotomy impacting on autistic and Alzheimer's pathologies. *Translational psychiatry*, 5(1), p.e501.
- Mallard, C., 2012. Innate Immune Regulation by Toll-Like Receptors in the Brain. *ISRN Neurology*, 2012, pp.1–19.
- Mantovani, S. et al., 2009. Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process. *Journal of neuroimmunology*, 210(1-2), pp.73–9.
- Martinez, C. et al., 1998. VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels in resting peritoneal macrophages: in vitro and in vivo studies. *Journal of neuroimmunology*, 85(2), pp.155–67.
- Mattiazzi, M. et al., 2002. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *The Journal*

of biological chemistry, 277(33), pp.29626–33.

- Matullo, C.M. et al., 2011. CNS recruitment of CD8+ T lymphocytes specific for a peripheral virus infection triggers neuropathogenesis during polymicrobial challenge. *PLoS Pathogens*, 7(12).
- McGeer, P.L. & McGeer, E.G., 2002. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve*, 26(4), pp.459–70.
- McGoldrick, P. et al., 2013. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(9), pp.1421–1436.
- Medzhitov, R. & Janeway Jr., C.A., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, 296(5566), pp.298–300.
- Menzie, J. et al., 2012. Taurine and central nervous system disorders. *Amino Acids*, pp.31–46.
- Merenlender-Wagner, a et al., 2013. Autophagy has a key role in the pathophysiology of schizophrenia. *Molecular psychiatry*, 20(February), pp.1–7.
- Miller, R.G. et al., 2007. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*, (1), p.CD001447.
- Mitsumoto, H. et al., 2008. Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 9(3), pp.177–83.
- Miyata, a et al., 1989. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 164(1), pp.567–574.
- Miyata, a. et al., 1990. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochemical and Biophysical*

Research Communications, 170(2), pp.643–648.

Moisse, K. & Strong, M.J., 2006. Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 1762(11-12), pp.1083–1093.

Moody, T.W. et al., 2011. VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 18(1), pp.61–7.

Mora, J.S., 2011. Tratado de Neurología. In J. Pacual, ed. p. 1013.

Morell, M., Souza-Moreira, L. & González-Rey, E., 2012. VIP in neurological diseases: more than a neuropeptide. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 12, pp.323–32.

Naor, S. et al., 2009. Development of ALS-like disease in SOD-1 mice deficient of B lymphocytes. *Journal of Neurology*, 256(8), pp.1228–1235.

Neumann, H., 2001. Control of glial immune function by neurons. *Glia*, 36(May), pp.191–9.

Neumann, H. et al., 1996. Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *The European journal of neuroscience*, 8(12), pp.2582–90.

Neumann, M. et al., 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5796), pp.130–3.

Nguyen, M.D. et al., 2004. Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(6), pp.1340–1349.

Niebroj-Dobosz, I. & Janik, P., 1999. Amino acids acting as transmitters in

- amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Acta neurologica Scandinavica*, 100(1), pp.6–11.
- Niessen, H.G. et al., 2006. In vivo quantification of spinal and bulbar motor neuron degeneration in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of ALS by T2 relaxation time and apparent diffusion coefficient. *Experimental neurology*, 201(2), pp.293–300.
- Niessen, H.G. et al., 2007. Metabolic progression markers of neurodegeneration in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci*, 25(6), pp.1669–1677.
- Nikceovich, K.M. et al., 1997. IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(2), pp.614–21.
- O’Doriso, M.S. et al., 1981. Vasoactive intestinal polypeptide modulation of lymphocyte adenylate cyclase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 127(6), pp.2551–4.
- Offen, D. et al., 1998. Antibodies from ALS patients inhibit dopamine release mediated by L-type calcium channels. *Neurology*, 51(4), pp.1100–3.
- Ono, S. et al., 2001. Increased interleukin-6 of skin and serum in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 187(1-2), pp.27–34.
- Onoue, S., Yamada, S. & Yajima, T., 2007. Bioactive analogues and drug delivery systems of vasoactive intestinal peptide (VIP) for the treatment of asthma/COPD. *Peptides*, 28(9), pp.1640–50.
- Orr, H.T., 2011. FTD and ALS: genetic ties that bind. *Neuron*, 72(2), pp.189–190.
- De Paola, M. et al., 2012. Neuroprotective effects of toll-like receptor 4 antagonism in spinal cord cultures and in a mouse model of motor neuron degeneration. *Mol Med*, 18(6), pp.971–981.
- Passemard, S. et al., 2011. VIP-induced neuroprotection of the developing brain. *Current pharmaceutical design*, 17(10), pp.1036–9.

- Perry, V.H., 2004. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18(5), pp.407–413.
- Pfeuffer, J. et al., 1999. Toward an in vivo neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time (1)H NMR spectra of the rat brain. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)*, 141(1), pp.104–20.
- Piggins, H.D. & Cutler, D.J., 2003. The roles of vasoactive intestinal polypeptide in the mammalian circadian clock. *The Journal of endocrinology*, 177(1), pp.7–15.
- Pincus, D.W., DiCicco-Bloom, E.M. & Black, I.B., 1990. Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblasts. *Nature*, 343(6258), pp.564–7.
- Piro, E.P. et al., 1999. 1H-MRS evidence of neurodegeneration and excess glutamate + glutamine in ALS medulla. *Neurology*, 53(1), pp.71–9.
- Piper, P.J., Said, S.I. & Vane, J.R., 1970. Effects on smooth muscle preparations of unidentified vasoactive peptides from intestine and lung. *Nature*, 225(5238), pp.1144–6.
- Plaitakis, a & Constantakakis, E., 1993. Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research bulletin*, 30(3-4), pp.381–386.
- Pocock, J.M. & Liddle, A.C., 2001. Microglial signalling cascades in neurodegenerative disease. *Prog Brain Res*, 132, pp.555–565.
- Pokrishevsky, E. et al., 2012. Aberrant localization of FUS and TDP43 is associated with misfolding of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 7(4), p.e35050.
- Poloni, M. et al., 2000. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*, 287(3), pp.211–4.

- Pozo, D. et al., 1997. Functional characterization and mRNA expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) type I receptors in rat peritoneal macrophages. *Biochimica et biophysica acta*, 1359(3), pp.250–62.
- Pozo, D. et al., 2000. Immunobiology of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Immunol Today*, 21(1), pp.7–11.
- Pozo, D., 2003. VIP- and PACAP-mediated immunomodulation as prospective therapeutic tools. *Trends Mol Med*, 9(5), pp.211–217.
- Pozo, D., Anderson, P. & Gonzalez-Rey, E., 2009. Induction of alloantigen-specific human T regulatory cells by vasoactive intestinal peptide. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(7), pp.4346–59.
- Pozo, D. & Delgado, M., 2004. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(12), pp.1325–34.
- Prineas, J.W. & Wright, R.G., 1978. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 38(4), pp.409–21.
- Provencher, S.W., 1993. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magnetic resonance in medicine*, 30(6), pp.672–9.
- Quintana, F.J. et al., 2006. NAP, a peptide derived from the activity-dependent neuroprotective protein, modulates macrophage function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1070, pp.500–6.
- Ransohoff, R.M. & Benveniste, E.N., 1996. *Cytokines and the CNS*.
- Reaume, A.G. et al., 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after

- axonal injury. *Nature genetics*, 13(1), pp.43–7.
- Reichert, F. et al., 2001. Modulation (inhibition and augmentation) of complement receptor-3-mediated myelin phagocytosis. *Neurobiology of disease*, 8(3), pp.504–12.
- Renton, A.E. et al., 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), pp.257–68.
- Righi, V. et al., 2009. 1H HR-MAS and genomic analysis of human tumor biopsies discriminate between high and low grade astrocytomas. *NMR in biomedicine*, 22(6), pp.629–37.
- Ringer, C. et al., 2013. PACAP signaling exerts opposing effects on neuroprotection and neuroinflammation during disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, 54, pp.32–42.
- Ringholz, G.M. et al., 2005. Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology*, 65(4), pp.586–90.
- Roberson, R. et al., 2012. Neuroprotective peptides influence cytokine and chemokine alterations in a model of fetal alcohol syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*, 207(6), pp.499.e1–5.
- Roche, J.C. et al., 2012. A proposed staging system for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, 135(Pt 3), pp.847–52.
- Romagne, F., 2007. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today*, 12(1-2), pp.80–87.
- Rosen, D.R. et al., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), pp.59–62.
- Ross, B. & Bluml, S., 2001. Magnetic resonance spectroscopy of the human

- brain. *Anat Rec*, 265(2), pp.54–84.
- Rostène, W.H., 1984. Neurobiological and neuroendocrine functions of the vasoactive intestinal peptide (VIP). *Progress in neurobiology*, 22(2), pp.103–29.
- Rothstein, J.D., 2009. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*, 65 Suppl 1, pp.S3–9.
- Rowland, L.P., 2001. How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Archives of neurology*, 58(3), pp.512–5.
- Rozen, S., Cudkowicz, M. & Bogdanov, M., 2005. Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease. *Metabolomics*, 1(2), pp.101–108.
- Russell Brain, W., 1933. Diseases of the Nervous System by Brain. *Oxford University Press. London*.
- Said, S.I., Berisha, H.I. & Pakbaz, H., 1996. Excitotoxicity in the lung: N-methyl-D-aspartate-induced, nitric oxide-dependent, pulmonary edema is attenuated by vasoactive intestinal peptide and by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10), pp.4688–4692.
- Said, S.I., Hamidi, S.A. & Gonzalez Bosc, L., 2010. Asthma and pulmonary arterial hypertension: do they share a key mechanism of pathogenesis? *The European respiratory journal*, 35(4), pp.730–4.
- Said, S.I. & Mutt, V., 1970a. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 169(3951), pp.1217–8.
- Said, S.I. & Mutt, V., 1970b. Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature*, 225(5235), pp.863–4. Available at:
- Said, S.I. & Rosenberg, R.N., 1976. Vasoactive intestinal polypeptide: abundant

immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. *Science (New York, N.Y.)*, 192(4242), pp.907–8.

Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*, 6(4), pp.345–52.

Sakaguchi, S. et al., 2011. Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(7), pp.3808–21.

Sakaguchi, S. et al., 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*, 133(5), pp.775–787.

Salmina, A.B. et al., 2015. Astroglial control of neuroinflammation: TLR3-mediated dsRNA-sensing pathways are in the focus. *Rev Neurosci*, 26(2), pp.143–159.

Satoh, J. et al., 1991. Expression and induction of intercellular adhesion molecules (ICAMs) and major histocompatibility complex (MHC) antigens on cultured murine oligodendrocytes and astrocytes. *Journal of neuroscience research*, 29(1), pp.1–12.

Schmitt-John, T., 2015. VPS54 and the wobbler mouse. *Frontiers in neuroscience*, 9, p.381.

Schrooten, M. et al., 2011. Benefit of the Awaji diagnostic algorithm for amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *Annals of neurology*, 70(1), pp.79–83.

Schwartz, J.P., 1992. Neurotransmitters as neurotrophic factors: a new set of functions. *International review of neurobiology*, 34, pp.1–23.

Servoss, S.J. et al., 2001. IGF-I as a mediator of VIP/activity-dependent

- neurotrophic factor-stimulated embryonic growth. *Endocrinology*, 142(8), pp.3348–53.
- Sherwood, N.M. et al., 2000. The Origin and Function of the Pituitary Adenylate. *Endocrine Reviews*, 21(October), pp.619–670.
- Shinohara, K. et al., 1994. Circadian rhythms in the release of vasoactive intestinal polypeptide and arginine-vasopressin in organotypic slice culture of rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience letters*, 170(1), pp.183–6.
- Siciliano, G. et al., 2010. Clinical trials for neuroprotection in ALS. *CNS & neurological disorders drug targets*, 9(3), pp.305–13.
- Siddique, T. & Ajroud-Driss, S., 2011. Familial amyotrophic lateral sclerosis, a historical perspective. *Acta myologica: myopathies and cardiomyopathies: official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases*, 30(2), pp.117–20.
- Simone, I.L. et al., 2011. Serum N-acetylaspartate level in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, 68(10), pp.1308–1312.
- Simpson, E.P. et al., 2004. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology*, 62(10), pp.1758–65.
- Sitter, B. et al., 2010. Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy. *NMR in biomedicine*, 23(4), pp.424–31.
- Smith, R.G. et al., 1996. Autoimmunity and ALS. *Neurology*, 47(4 Suppl 2), pp.S40–5; discussion S45–6.
- Smith, R.G. et al., 1998. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*, 44(4), pp.696–9.

- Sorg, O. & Magistretti, P.J., 1992. Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(12), pp.4923–4931.
- Spalloni, A., Nutini, M. & Longone, P., 2013. Role of the N-methyl-d-aspartate receptors complex in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(2), pp.312–22.
- Sreedharan, J. et al., 2008. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5870), pp.1668–72.
- Sta, M. et al., 2011. Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: evidence of complement activation. *Neurobiol Dis*, 42(3), pp.211–220.
- Staines, D.R., 2008. Are multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis autoimmune disorders of endogenous vasoactive neuropeptides? *Med Hypotheses*, 70(2), pp.413–418.
- Staines, D.R., Brenu, E.W. & Marshall-Gradisnik, S., 2009. Postulated vasoactive neuropeptide immunopathology affecting the blood-brain/blood-spinal barrier in certain neuropsychiatric fatigue-related conditions: A role for phosphodiesterase inhibitors in treatment? *Neuropsychiatr Dis Treat*, 5, pp.81–89.
- Stoddard, S.L. et al., 1991. Decreased levels of [Met]enkephalin, neuropeptide Y, substance P, and vasoactive intestinal peptide in parkinsonian adrenal medulla. *Experimental neurology*, 114(1), pp.23–7.
- Su, X. & Federoff, H.J., 2014. Immune responses in Parkinson's disease: interplay between central and peripheral immune systems. *BioMed research international*, 2014, p.275178.
- Suhy, J. et al., 2002. Early detection and longitudinal changes in amyotrophic

- lateral sclerosis by (1)H MRSI. *Neurology*, 58(5), pp.773–9.
- Sutmuller, R.P.M. et al., 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*, 116(2), pp.485–494.
- Takeda, K. & Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 16(1), pp.3–9.
- Tamashiro, T.T., Dalgard, C.L. & Byrnes, K.R., 2012. Primary Microglia Isolation from Mixed Glial Cell Cultures of Neonatal Rat Brain Tissue. *Journal of Visualized Experiments*, (66), pp.1–5.
- Tan, S.M. et al., 2000. Effect of integrin beta 2 subunit truncations on LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) assembly, surface expression, and function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(5), pp.2574–81.
- Tan, Y. & Waschek, J. a, 2011. Targeting VIP and PACAP receptor signalling: new therapeutic strategies in multiple sclerosis. *Asn Neuro*, 3(4), pp.195–212.
- Tan, Y.-V. et al., 2014. VPAC2 (vasoactive intestinal peptide receptor type 2) receptor deficient mice develop exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis with increased Th1/Th17 and reduced Th2/Treg responses. *Brain, behavior, and immunity*, 2, pp.1–9.
- Tang, Q. & Bluestone, J.A., 2008. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature immunology*, 9(3), pp.239–44.
- Tarasiuk, J. et al., 2012. CSF markers in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm*, 119(7), pp.747–757.
- Tateishi, T. et al., 2010. CSF chemokine alterations related to the clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 222(1-2), pp.76–81.
- Tiemessen, M.M. et al., 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce

alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), pp.19446–51.

Tomimatsu, N. & Arakawa, Y., 2008. Survival-promoting activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the presence of phosphodiesterase inhibitors on rat motoneurons in culture: cAMP-protein kinase A-mediated survival. *Journal of neurochemistry*, 107(3), pp.628–35.

Trinchieri, G. & Sher, A., 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology*, 7(3), pp.179–190.

Tunçel, N. et al., 2012. Antioxidant and anti-apoptotic activity of vasoactive intestinal peptide (VIP) against 6-hydroxy dopamine toxicity in the rat corpus striatum. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 46(1), pp.51–7.

Tunçel, N. et al., 2005. Brain mast cells and therapeutic potential of vasoactive intestinal peptide in a Parkinson's disease model in rats: brain microdialysis, behavior, and microscopy. *Peptides*, 26(5), pp.827–36.

Turner, B.J. & Talbot, K., 2008. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol*, 85(1), pp.94–134.

Tzartos, J.S. et al., 2014. LRP4 antibodies in serum and CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Annals of clinical and translational neurology*, 1(2), pp.80–7.

Vargas, M. & Johnson, J., 2010. Astrogliosis in Amyotrophic Lateral Sclerosis and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics*, 7(4), pp.471–481.

Verschuere J De Coster L, Van Damme P and Van Laere K, V.A., 2013. Impact of the C9orf72 expansion on brain glucose metabolism in ALS patients. *J Nucl Med.*, 54 ((Supplement 2)), p.155.

- Vezzani, A. et al., 2002. Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*, 43 Suppl 5, pp.30–5.
- De Vos, K.J. et al., 2007. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human molecular genetics*, 16(22), pp.2720–8.
- Vu, J.P. et al., 2015. Regulation of Appetite, Body Composition, and Metabolic Hormones by Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP). *Journal of molecular neuroscience : MN*, 56(2), pp.377–87.
- Vukosavic, S. et al., 2000. Delaying caspase activation by Bcl-2: A clue to disease retardation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(24), pp.9119–25.
- Waschek, J. a., 2013. VIP and PACAP: Neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair. *British Journal of Pharmacology*, 169, pp.512–523.
- Wegorzewska, I. & Baloh, R.H., 2011. TDP-43-based animal models of neurodegeneration: new insights into ALS pathology and pathophysiology. *Neuro-degenerative diseases*, 8(4), pp.262–74.
- Werdelin, L. et al., 1989. Neuropeptides and neural cell adhesion molecule (NCAM) in CSF from patients with ALS. *Acta neurologica Scandinavica*, 79(3), pp.177–81.
- Wiedemann, F.R. et al., 2002. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *Journal of neurochemistry*, 80(4), pp.616–25.
- Wijesekera, L.C. & Leigh, P.N., 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet journal of rare diseases*, 4, p.3.

- Williamson, T.L. & Cleveland, D.W., 1999. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nature neuroscience*, 2(1), pp.50–56.
- Winkler, E. a. et al., 2013. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 125, pp.111–120.
- Wong, P.C. et al., 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, 14(6), pp.1105–16.
- Wright, G.J. et al., 2003. Characterization of the CD200 Receptor Family in Mice and Humans and Their Interactions with CD200. *The Journal of Immunology*, 171(6), pp.3034–3046.
- Wu, H. et al., 2005. Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain research*, 1038(2), pp.123–31.
- Wuolikainen, A. et al., 2012. ALS patients with mutations in the SOD1 gene have an unique metabolomic profile in the cerebrospinal fluid compared with ALS patients without mutations. *Mol Genet Metab*, 105(3), pp.472–478.
- Wuolikainen, A. et al., 2011. Disease-related changes in the cerebrospinal fluid metabolome in amyotrophic lateral sclerosis detected by GC/TOFMS. *PLoS One*, 6(4), p.e17947.
- Wuolikainen, A. et al., 2009. Optimization of procedures for collecting and storing of CSF for studying the metabolome in ALS. *Amyotroph Lateral Scler*, 10(4), pp.229–236.
- Wuolikainen, A. et al., 2016. Multi-platform mass spectrometry analysis of the CSF and plasma metabolomes of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. *Molecular bioSystems*, 12(4), pp.1287–98.

- Xiang, W., Chao, Z.Y. & Feng, D.Y., 2015. Role of Toll-like receptor/MYD88 signaling in neurodegenerative diseases. *Rev Neurosci*.
- Xu, Y. et al., 2012. Class A scavenger receptor promotes cerebral ischemic injury by pivoting microglia/macrophage polarization. *Neuroscience*, 218, pp.35–48.
- Yang, M.H. et al., 2012. Activity-dependent neuroprotector homeobox protein: A candidate protein identified in serum as diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Journal of Proteomics*, 75(12), pp.3617–3629.
- Zaltzman, R. et al., 2004. Brain injury-dependent expression of activity-dependent neuroprotective protein. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 24(2), pp.181–7.
- Zaltzman, R. et al., 2003. Injections of the neuroprotective peptide NAP to newborn mice attenuate head-injury-related dysfunction in adults. *Neuroreport*, 14(3), pp.481–4.
- Zaltzman, R. et al., 2005. The influence of the peptide NAP on Mac-1-deficient mice following closed head injury. *Peptides*, 26(8), pp.1520–1527.
- Zamostiano, R. et al., 2001. Cloning and characterization of the human activity-dependent neuroprotective protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), pp.708–714.
- Zanin-Zhorov, A. et al., 2007. Cutting Edge: T Cells Respond to Lipopolysaccharide Innately via TLR4 Signaling. *The Journal of Immunology*, 179(1), pp.41–44.
- Zemlyak, I. et al., 2007. NAP protects hippocampal neurons against multiple toxins. *Peptides*, 28(10), pp.2004–8.
- Zemlyak, I. et al., 2009. The microtubule interacting drug candidate NAP protects against kainic acid toxicity in a rat model of epilepsy. *Journal of neurochemistry*, 111(5), pp.1252–63.

- Zang, D.W. & Cheema, S.S., 2002. Degeneration of corticospinal and bulbo-spinal systems in the superoxide dismutase 1(G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*, 332(2), pp.99–102.
- Zhang, R. et al., 2009. Circulating endotoxin and systemic immune activation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *Journal of neuroimmunology*, 206(1-2), pp.121–4.
- Zhang, R. et al., 2011. Gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *Journal of Neuroimmunology*, 230(1-2), pp.114–123.
- Zhao, W. et al., 2010. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia*, 58(2), pp.231–43.
- Zhao, W. et al., 2012. Regulatory T lymphocytes from ALS mice suppress microglia and effector T lymphocytes through different cytokine-mediated mechanisms. *Neurobiology of Disease*, 48(3), pp.418–428.
- Zhao, W., Beers, D.R. & Appel, S.H., 2013. Immune-mediated mechanisms in the pathoproduction of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 8(4), pp.888–99.
- Zhou, H. et al., 2010. Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS genetics*, 6(3), p.e1000887.
- Zlokovic, B. V., 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(12), pp.723–38.
- Zoccollella, S. et al., 2011. An exploratory study of serum urate levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, 258(2), pp.238–243.
- Zoccollella, S. et al., 2008. Elevated plasma homocysteine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 70(3), pp.222–225.

APÉNDICE: PUBLICACIONES



APÉNDICE: PUBLICACIONES

- ◆ **Marta Cejudo-Guillén**, M. Lourdes Ramiro-Gutiérrez, Adahir Labrador-Garrido, Aránzazu Díaz-Cuenca, David Pozo. Nanoporous silica microparticle interaction with toll-like receptor agonists in macrophages. *Acta Biomaterialia*, 8(12), pp.4295–4303. 2012.

- ◆ Adahir Labrador-Garrido, **Marta Cejudo-Guillén**, Rebecca Klippstein, Erwin J. De Genst, Laura Tomas-Gallardo, María M. Leal, Javier Villadiego, Juan J. Toledo-Aral, Christopher M. Dobson, David Pozo & Cintia Roodveldt. Chaperoned amyloid proteins for immune manipulation: α -Synuclein/Hsp70 shifts immunity toward a modulatory phenotype. *Immunity, Inflammation and Disease*, 2(4), pp.226–238. 2014.

- ◆ Adahir Labrador-Garrido, **Marta Cejudo-Guillén**, Soumya Daturpalli, María M Leal, Rebecca Klippstein, Erwin J De Genst, Javier Villadiego, Juan J Toledo-Aral, Christopher M Dobson, Sophie E Jackson, David Pozo, Cintia Roodveldt. Chaperome screening leads to identification of Grp94/Gp96 and FKBP4/52 as modulators of the α -synuclein-elicited immune response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(2), pp.564–77. 2015.

- ◆ Diana Caballero-Hernández, Miguel G Toscano, **Marta Cejudo-Guillen**, Maria L García-Martin, Soledad López, Jaime M Franco, Francisco J Quintana, Cintia Roodveldt, David Pozo. The “Omics” of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Trends in Molecular Medicine*, 22(1), pp.1–15. 2015.

