



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

**NUEVAS TERAPIAS EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS
DE LA MOTONEURONA**

Autor/es

V. Alexia Bertone Núñez

Director/es

Dra. Rosario Osta Pinzolas

Facultad de Veterinaria
2015

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. La Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	4
2.1.1. Definición de la enfermedad	4
2.1.2. Etiología	5
2.1.3. Patogenia	6
2.1.4. Síntomas	10
2.1.5. Diagnóstico.....	11
2.1.6. Tratamiento	12
2.2. Tratamientos experimentales en la ELA: 5-Fluorouracilo	13
2.2.1. Estructura del 5-Fluorouracilo.....	14
2.2.2. Mecanismo de acción del 5-Fluorouracilo	15
2.2.3. Efectos del 5-Fluorouracilo sobre la médula ósea.....	18
2.2.4. Toxicidad y efectos secundarios.....	19
2.2.5. Uso del 5-Fluorouracilo en el tratamiento de la ELA	20
3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	22
4. METODOLOGÍA.....	23
4.1. Animales.....	23
4.2. Genotipado	23
4.3. Administración de 5-FU	23
4.4. Extracción y procesamiento de muestras	24
4.4.1. Extracción de sangre y médula ósea.....	24
4.4.2. Recuento en cámara de Neubauer	25
4.4.3. Tinción del frotis de médula ósea.....	25
4.4.4. Extracción de médula espinal.....	26
4.4.5. Inmunofluorescencia	26
4.5. Pruebas de comportamiento	27

4.5.1. Peso	27
4.5.2. Test de la rejilla	27
4.5.3. Test del rotarod.....	27
4.5.4. Supervivencia	28
4.6. Análisis de los datos y estadística	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1. La aplicación de 5-FU produce inmunodepresión en ratones SOD1 ^{G93A}	29
5.2. La administración continuada de 5-FU no mejora la supervivencia ni el comportamiento motor en los ratones SOD1 ^{G93A}	33
5.3. La aplicación del 5-FU podría disminuir el número de agregados de SOD1 mal plegada.....	37
6. CONCLUSIONES.....	42
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa, en la que resultan afectadas tanto las motoneuronas superiores como las inferiores, acabando con la muerte del enfermo dentro de los 3-5 años después de la aparición de los primeros síntomas. Hasta el momento no existe ningún tratamiento curativo frente a ella. El 5-Fluorouracilo (5-FU), quimioterápico ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer, ha demostrado en estudios previos en el modelo murino de ELA SOD1^{G93A} una mejora significativa de la supervivencia y los síntomas motores. El objetivo general del presente trabajo es mejorar la aplicación terapéutica del 5-FU para la Esclerosis Lateral Amiotrófica, investigando su mecanismo de acción e incrementando su eficacia en los modelos animales de SOD1^{G93A}. Los resultados de los estudios realizados muestran que el 5-FU produce una depleción de las células de la serie blanca y disminuye el número de agregados de proteína SOD1 mal plegada. Además, se ha observado que una pauta de administración continuada del 5-FU no modifica la supervivencia ni los síntomas motores de los animales.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease, affecting both upper and lower motor neurons, and leading to patient death within 3-5 years after the onset of symptoms. So far there is no curative treatment against this illness. 5-Fluorouracil (5-FU), a chemotherapeutic drug widely used in cancer therapy, has shown a significant improvement of survival and motor symptoms in previous studies in SOD1^{G93A} murine model of ALS. The general objective of this work is to improve the therapeutic application of 5-FU for Amyotrophic Lateral Sclerosis, investigating the mechanism of action and increasing its effectiveness in animal models SOD1G93A. The result of these studies shows that 5-FU causes a depletion of bone marrow white cells and decreases the number of aggregates of misfolded SOD1 protein in the spinal cord. Furthermore, it has been observed that a pattern of continued administration of 5-FU does not modify the survival or motor symptoms of animals.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La Esclerosis Lateral Amiotrófica

2.1.1. Definición de la enfermedad

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva de pronóstico fatal. Clínicamente se caracteriza por una atrofia muscular progresiva y muerte en la mayoría de los casos dentro de los 3-5 años después de la aparición de los primeros síntomas.

Fue descrita por primera vez en el año 1874 por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot, quien la definió como una enfermedad independiente además de hacer una descripción de las lesiones halladas en el sistema nervioso central y relacionarlas con las manifestaciones clínicas en los enfermos (Kumar et al., 2011). Por este motivo se la conoce en Francia con el nombre de enfermedad de Charcot. También es conocida con otros nombres, por ejemplo, en Estados Unidos se la llama enfermedad de Lou Gehrig, por un famoso jugador de béisbol que falleció por esta causa, y en Reino Unido se le llama enfermedad de la motoneurona por ser la de mayor importancia entre las que afectan a estas estructuras en el adulto.

El significado de su nombre es: “Esclerosis lateral” por el endurecimiento al tacto observado en las autopsias de los tractos corticoespinales anteriores y laterales donde las motoneuronas degeneradas son reemplazadas por gliosis, y “Amiotrófica” refiriéndose a la atrofia en las fibras musculares que sufren la denervación, manifestándose como debilidad en los músculos afectados y fasciculaciones (Rowland y Shneider, 2001).

La ELA afecta a personas de todo el mundo, aunque no se conoce la incidencia exacta en todos los países. Un estudio poblacional realizado en Europa dio como resultado una incidencia de ELA de 2,16 nuevos casos al año por cada 100.000 habitantes, y bastante uniformidad entre los países estudiados (Logrosino et al., 2010). Estos datos son muy similares a los obtenidos en estudios epidemiológicos realizados en otros países, aunque también se ha descrito la presencia de focos de mayor incidencia por ejemplo en la isla de Guam.

Es la enfermedad de la motoneurona más frecuente en el adulto. En la mayoría de los casos los síntomas aparecen entre los 47-52 años de edad en ELA familiar, y entre los 58-63 años en ELA esporádica. La incidencia decrece bruscamente después de los 80 años (Logroscino et al., 2010). La media de supervivencia desde comienzan los síntomas es de entre 20 y 48 meses, pero un 10-20% de los pacientes viven más de 10 años. Teniendo en cuenta los primeros síntomas que aparecen, algunos pacientes tienen peor pronóstico que otros, por ejemplo, si las primeras manifestaciones se dan edades tardías o si los primeros síntomas son de tipo bulbar (Chiò et al., 2009).

La ELA es más frecuente en hombres que en mujeres, con un ratio de 1,5:1. Esto ha sido atribuido a un posible efecto protector hormonal en las mujeres y a una mayor exposición de los hombres a posibles factores de riesgo ambientales (Wijesekera y Leigh, 2009). Los factores de riesgo asociados con la ELA aceptados hasta ahora son: el sexo masculino, la edad avanzada y un historial familiar con casos de ELA (Ingre et al., 2015).

2.1.2. Etiología

Aún se desconocen la o las causas que desencadenan la ELA. Existen varias hipótesis sobre factores genéticos, ambientales, alteraciones metabólicas, etc., que intentan explicar su origen. La explicación cada vez más aceptada es que la ELA es consecuencia de la combinación de varios factores.

Tradicionalmente, la ELA se clasifica como “familiar” (ELAF) si el paciente tiene o tuvo algún familiar también enfermo de ELA. El 5-10% de los casos se corresponden con este tipo de ELA. Los restantes 90-95% se clasifican como ELA “esporádica” (ELAE) por no haber antecedentes familiares de esta enfermedad.

Factores genéticos

En el caso de la ELAF se sabe que es hereditaria. Se conocen muchas mutaciones causantes de la enfermedad, la mayoría de ellas de herencia autosómica dominante, pero también se han descrito algunas autosómicas recesivas y de herencia materna. Las mutaciones no se han encontrado solo en casos de ELAF, sino también en algunos casos de ELAE.

En 1993 se publicaron las primeras mutaciones genéticas descubiertas relacionadas con la enfermedad, en el gen SOD1 que codifica para la enzima Cu/Zn superóxido dismutasa (enzima SOD1). Estas mutaciones en el gen SOD1 aparecen en un 20% de casos de ELAF con herencia autosómica dominante, y en el 2% de casos de ELAE (Rosen et al., 1993). Desde entonces se han identificado más de 25 genes relacionados con la ELA (Marangi y Traynor, 2015). Los más importantes en relación con los casos de ELAF son: C9orf72, SOD1 y TARDBP. El gen C9orf72, del que todavía se desconoce la función, se ha encontrado mutado tanto en casos de ELA como de demencia frontotemporal (FTD). Este gen relaciona con hasta un 40% de ELAF y un 7-10% de ELAE, aunque la prevalencia de la mutación es variable entre distintos países. TARDBP es un gen que codifica para TDP-43, una proteína de unión a DNA y RNA. En este gen se han encontrado 30 mutaciones diferentes presentes en un 5% de los pacientes con ELAF y 1% con ELAE (Ingre et al., 2015).

Factores ambientales

Algunos factores que podrían tener relación con la enfermedad son: el tabaco, la exposición a ciertos metales pesados o a pesticidas, causas nutricionales, virales, autoinmunes, etc. Se ha observado una mayor incidencia de la enfermedad en personas con ciertas ocupaciones, como deportistas profesionales, aunque no se sabe si se debe a la actividad física extenuante, los repetidos traumatismos en la cabeza o a ciertas drogas para mejorar el rendimiento deportivo (Ingre et al., 2015). Los estudios realizados para observar la influencia de estos factores en la mayoría de los casos no son concluyentes.

2.1.3. Patogenia

En la patogenia de la ELA sigue habiendo muchas preguntas sin respuesta. A pesar de que se conocen mutaciones genéticas involucradas y se han descrito varios cambios patológicos que llevan a la muerte de las motoneuronas, aún se desconocen exactamente los mecanismos moleculares que intervienen.

Entre los cambios patológicos que se han descrito se encuentran: la formación de agregados proteicos, la exotoxicidad mediada por glutamato, el estrés oxidativo, las alteraciones mitocondriales, la alteración en el transporte axonal, la participación de la respuesta inmune e inflamación, la alteración en la autofagia, apoptosis, alteración del

tráfico endosomal, etc. A continuación se explicará de forma resumida cada uno de ellos.

Formación de agregados proteicos: Los agregados proteicos se han observado no solo en ELA, sino también en otras enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson. En la ELA se cree que estos agregados o sus precursores perturban la homeostasis normal de la célula e inducen estrés celular interfiriendo en varias funciones como el transporte intracelular, la arquitectura del citoesqueleto, la función mitocondrial y otros. A su vez el estrés celular da lugar a la retracción axonal y en última instancia a la muerte celular (Robberecht y Philips, 2013).

Como se ha mencionado anteriormente, las mutaciones en el gen que codifica para la enzima SOD1 se encuentran presentes en el 20% de los casos de ELAF y en el 2% de ELAE. La función primaria de la enzima SOD1 es convertir los radicales libres superóxido, que son altamente tóxicos, en peróxido de hidrógeno y agua. En las mutaciones de la SOD1 la función enzimática puede estar disminuida, pero esta no parece ser la causa de la enfermedad, ya que los ratones *knock out* para SOD1 no la desarrollan. La proteína SOD1 mal plegada, además de formar agregados, puede reaccionar inespecíficamente con variedad de sustratos, convirtiéndose en productora de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. El mecanismo exacto de esta toxicidad sobre las neuronas motoras es desconocido (Grad et al., 2015).

La agregación se produce porque en lugar de formarse el dímero de SOD1 nativa estable, se forman monómeros intermedios mal plegados que luego se incorporan a estructuras oligoméricas mayores. Además existe la hipótesis de un mecanismo *prion-like*, por el cual las proteínas mal plegadas serían capaces de inducir cambios conformacionales en las proteínas SOD1 normales. Los agregados no aparecen solo en casos de SOD1 mutada, sino también en casos de SOD1 normal debido a la oxidación post-transcripcional. Se han detectado estos agregados en la médula espinal tanto de pacientes con ELAF como de ELAE, y también se han visto en casos negativos a las mutaciones del gen SOD1. Además en todas las cepas de ratones mutantes para SOD1 se han observado las inclusiones de SOD1 mutada en el citosol de las motoneuronas coincidiendo con la aparición de los síntomas y creciendo de tamaño conforme avanzaba la enfermedad. Por todo lo dicho anteriormente, se cree que la SOD1 mal

plegada podría ser común a todas las formas de ELA y tener un papel clave en la patogenia de la enfermedad (Grad et al., 2015).

Este mecanismo patológico no solamente ocurre con las mutaciones en el gen SOD1, existen otras mutaciones en la ELA que inducen también a la formación de agregados proteicos, por ejemplo, la proteína TDP-43, de la cual se han encontrado agregados tanto en ELA como en FTD.

Excitotoxicidad: El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante en el sistema nervioso central humano (Shaw, 2005). Excitotoxicidad es el nombre que se le da al daño neuronal producido por la excesiva estimulación causada por este neurotransmisor sobre los receptores postsinápticos. Con esta sobreestimulación se produce una entrada masiva de iones calcio en las neuronas, lo que lleva a un aumento de la formación de óxido nítrico y acaba en muerte neuronal. En algunos enfermos de ELA se han observado elevados niveles de glutamato en el líquido cefalorraquídeo (Wijesekera y Leigh, 2009). El mecanismo de acción del riluzol, utilizado para el tratamiento de la ELA, está relacionado con la liberación y recaptación del glutamato en la sinapsis.

Estrés oxidativo: Se cree que el estrés oxidativo está ligado a la neurodegeneración, ya que la acumulación de especies reactivas de oxígeno lleva a la muerte celular (Wijesekera y Leigh, 2009). La principal hipótesis es que la enzima SOD1 mutada interacciona con sustratos con los que normalmente no lo haría, dando como resultado la producción de radicales libres dañinos para las células nerviosas (Shaw, 2005).

Alteraciones mitocondriales: Hay evidencias de que las alteraciones mitocondriales participan en los mecanismos de neurodegeneración en la ELA. Se han observado alteraciones en la morfología y en el funcionamiento de la mitocondria en enfermos de ELA desde estadios tempranos de la enfermedad, por ejemplo, elevados niveles de calcio o actividad de la cadena respiratoria disminuida con la consecuente deficiencia en el metabolismo energético. También se han descrito mutaciones en el ADN mitocondrial en enfermos de ELA (Cozzolino y Carrì, 2012; Wijesekera y Leigh, 2009). La liberación de citocromo C de la mitocondrias puede activar las caspasas y producir la muerte celular.

Alteraciones en el transporte axonal: En los axones de las neuronas motoras se realiza el transporte, tanto anterógrado como retrógrado, de moléculas y orgánulos a través de un sistema de neurofilamentos. La organización anormal y el acúmulo de neurofilamentos son características patológicas de la ELA. En experimentos realizados en ratones mutantes para SOD1 se ha observado un transporte alterado a través de los axones de neuronas motoras (Wijesekera y Leigh, 2009).

Apoptosis: La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, por el cual se eliminan células que ya no son necesarias o que no funcionan correctamente. Puede desencadenarse por algún tipo de daño a la célula, por ejemplo debido al estrés oxidativo. Se pone en marcha una cascada de eventos, como la activación de las caspasas, que finalmente acabarán con la destrucción ordenada de la célula. Se ha observado en autopsias de personas muertas por ELA, que la morfología de las neuronas motoras degeneradas es compatible con la de una célula muerta por apoptosis (Shaw, 2005).

Alteración de la autofagia: Las proteínas defectuosas que son ubiquitinadas entran en la ruta del proteasoma para ser eliminadas en él. Las proteínas SOD1 mal plegadas deberían eliminarse por este sistema ubiquitin-proteasoma, sin embargo, aunque sean marcadas con ubiquitina escapan a este mecanismo, se acumulan formando agregados y dañan las células (Redler y Dokholyan, 2013).

Respuesta inmune e inflamación: existen evidencias de que la respuesta inmune y los mecanismos de la inflamación están involucrados activamente en la patogenia de la ELA. En el encéfalo y la médula espinal de pacientes con ELA y de los modelos animales de la enfermedad se han observado gran número de células de la microglía activadas, astrocitos, depósitos de IgGs e infiltraciones de linfocitos T. También se ha visto una activación anormal de monocitos y macrófagos activados en pacientes con ELAE, mostrando una correlación positiva con la progresión de la enfermedad. Aparentemente las sustancias liberadas en la inflamación contribuyen al estrés celular y a la muerte de motoneuronas en la ELA (Saleh et al., 2009; Tikka et al., 2002).

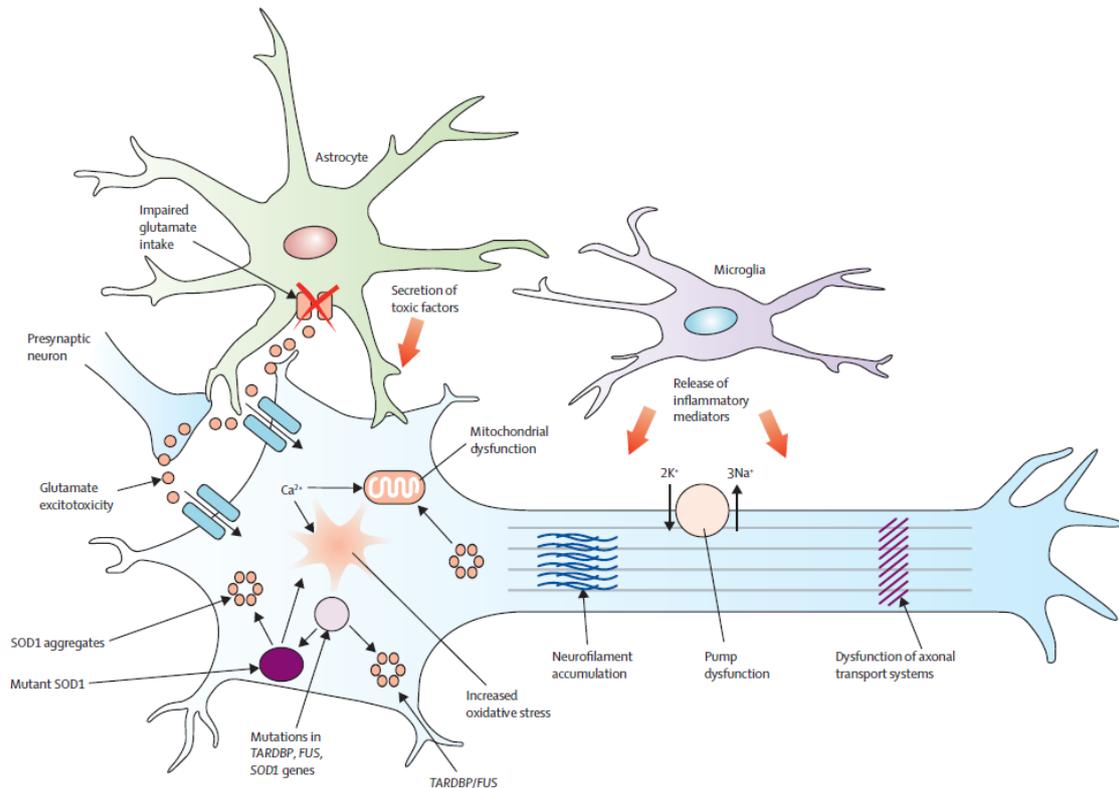


Figura 1: Algunos de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la patogénesis de la ELA (Kiernan et al., 2011).

2.1.4. Síntomas

La ELAE y la ELAF son indistinguibles por la sintomatología, aunque la ELAF suele manifestarse a edades más tempranas. La sintomatología y evolución de la enfermedad es muy heterogénea, incluso entre personas de la misma familia con la misma mutación.

Cualquier combinación de síntomas de motoneurona superior (MNS) y motoneurona inferior (MNI), particularmente si aparecen en el mismo miembro, en ausencia de dolor y disminución sensorial podrían llevar a incluir un estadio temprano de ELA en el diagnóstico diferencial. Lo más frecuente es que estén afectadas las MNS y MNI en el mismo territorio, pero en algunos casos pueden afectarse primero las de un tipo y luego las otras, o estar afectadas las de zonas diferentes (Gálvez et al., 2011). La hipertonía, reflejos enérgicos y respuestas plantares extensoras son síntomas de afectación de MNS. La pérdida de masa muscular, fasciculaciones y reflejos reducidos o ausentes en la extremidad reflejan afectación de MNI (Harwood et al., 2012).

Las principales formas de presentación de la enfermedad son: 1) *limb-onset* con una combinación de síntomas de MNS y MNI en la o las extremidades; 2) *bulbar-onset* que comienza con dificultades para hablar y tragar, y a continuación síntomas en las extremidades; 3) La esclerosis lateral primaria, que es la menos común, y en la que solo hay síntomas de MNS; y 4) la atrofia muscular progresiva, en la que solo hay síntomas de MNI (Kiernan et al., 2011).

Antes se creía que en la ELA se preservaban las funciones sensitiva, cognitiva, oculomotora, vesical y esfinteriana, pero actualmente algunos estudios indican que en algunos pacientes hay alteración sensitiva distal leve y alteración en la conducción nerviosa en al menos un músculo (Pugdahl et al., 2007). Las observaciones a lo largo de los años demostraron también que en algunos casos de ELA hay afectación cognitiva. Estudios realizados recientemente mostraron que en el 15-18% de casos de ELA también existe demencia frontotemporal (FTD), y en un 15% de los pacientes con FTD hay disfunción motora. En ambas patologías se han detectado agregados de TDP-43, una proteína de unión al ADN, en el sistema nervioso central, y se observado también las mutaciones en el C9orf72 aparecen en algunos casos en ambas patologías. Se habla de un “trastorno de espectro”, en el cual las mutaciones existentes más los factores ambientales harían que los síntomas se inclinen más hacia ELA o hacia FTD (Lattante et al., 2015).

2.1.5. Diagnóstico

No hay ninguna prueba que permita establecer un diagnóstico definitivo de la ELA. El diagnóstico es fundamentalmente clínico, se basa en la exploración neurológica, la observación de la evolución de los síntomas, y otras pruebas como la electromiografía y la resonancia magnética, que orientan el diagnóstico y permiten descartar otras enfermedades (Fernández-Lerones y de la Fuente-Rodríguez, 2010).

Para el diagnóstico de la ELA se utilizan los criterios de El Escorial, elaborados en 1994 y revisados en 1999, que hacen una clasificación en niveles de certeza diagnóstica. Según estos criterios, para el diagnóstico de ELA se requieren signos de MNS y MNI, con progresión normalmente rápida y afectación de varios segmentos medulares sin otra explicación alternativa. En base a esto clasifica en:

- **ELA definida:** si hay alteración de MNS y MNI en tres regiones medulares (bulbo, médula cervical, dorsal, lumbosacra).
- **ELA familiar definida:** además de MNS y MNI alteradas, confirmación de una mutación de ELAF.
- **ELA probable:** MNS y MNI afectadas en dos regiones.
- **ELA probable con respaldo analítico:** MNS y MNI afectadas en una región, y además indicios en la electromiografía de denervación en dos o más músculos de otra región.
- **ELA posible:** MNS y MNI afectadas en una región.

No obstante, aunque este sea el criterio diagnóstico consensuado, es necesario que cada caso sea evaluado individualmente, y se descarten el resto de causas incluidas en el diferencial antes de dar un diagnóstico de ELA (Gálvez et al., 2011). Además de la exploración neurológica, otras pruebas utilizadas para el diagnóstico son: la electromiografía, resonancia magnética, análisis de sangre y de líquido cefalorraquídeo, biopsia muscular, etc.

La falta de pruebas específicas hace que el diagnóstico se retrase meses y hasta años después de la aparición de los primeros síntomas. Por esto, la identificación de biomarcadores que permitan el diagnóstico de la ELA o que midan su evolución, sigue siendo una de las metas en la investigación de esta enfermedad.

2.1.6. Tratamiento

Hasta el momento no existe ningún tratamiento curativo frente a la ELA. El riluzol, que es el único fármaco aprobado para su tratamiento, no detiene el avance de la enfermedad, solo ralentiza su evolución. Se ha demostrado que el riluzol prolonga la supervivencia en los enfermos una media de entre 3 y 6 meses (Zoing et al., 2006).

Anteriormente se ha mencionado que en la ELA uno de los mecanismos patológicos es la excitotoxicidad debida al exceso de glutamato. El mecanismo de acción del riluzol no se conoce completamente, pero se cree que el fármaco interfiere con los receptores NMDA postsinápticos que responden al glutamato dejando entrar iones calcio a la célula, estabiliza los canales de sodio voltaje dependientes, inhibe la liberación de

glutamato en la terminal presináptica e incrementa la recaptación del glutamato extracelular (Wijesekera y Leigh, 2009).

Además del tratamiento con riluzol, se lleva a cabo también un tratamiento paliativo multidisciplinar con el objetivo de mejorar la calidad de vida del paciente. En este se incluye un tratamiento farmacológico para síntomas como la espasticidad, hipertonía mandibular, laringoespasma, sialorrea, dolor, alteraciones del sueño, depresión, ansiedad, etc. Conforme avanza la enfermedad la debilidad muscular compromete la mecánica respiratoria haciendo necesario el uso de sistemas de ventilación invasiva o no invasiva. (Quarracino et al., 2014).

La nutrición adecuada es otro punto importante en el cuidado de los enfermos de ELA. Por una parte debido a que la disfagia es una complicación muy común en esta enfermedad y puede llevar a una ingestión calórica insuficiente. Y por otra parte, porque en la ELA existe un metabolismo exacerbado de los lípidos, que lleva a una disminución de la masa corporal y a un incremento del gasto energético en reposo. Se ha demostrado experimentalmente en ratones SOD1 G93A que la suplementación de la dieta con determinados ácidos grasos, como los presentes en el aceite de oliva virgen extra, aumenta significativamente la supervivencia y el comportamiento motor de los animales (Oliván et al., 2014).

2.2. Tratamientos experimentales en la Esclerosis Lateral Amiotrófica: 5-Fluorouracilo

Como se ha mencionado anteriormente solo se conoce una mínima parte de la etiopatogenia de la ELA, en base a los cambios conocidos que ocurren a causa de la enfermedad se ha experimentado con diferentes tipos de terapias. Con algunas de ellas no se ha conseguido ninguna mejora, otras en cambio han dado algún resultado significativo, pero aún siguen en vías de experimentación.

En este momento existen 665 ensayos clínicos en todo el mundo debido a la dureza de la enfermedad. Una revisión de los numerosos estudios clínicos en pacientes puede observarse en la web (www.clinicaltrials.gov). Los tipos de tratamiento que se están estudiando son muy dispares, terapia antioxidante, antiexocitotóxica, de antiagregación proteica, antiinflamatoria, antiapoptótica, con factores neurotróficos,

ejercicio, fisioterapia, etc. Se están testando distintas terapias, tanto la farmacológica como terapias innovadoras (terapia génica y/o celular).

La aprobación de nuevos medicamentos para el tratamiento de cualquier enfermedad requiere que los mismos se sometan a una serie de pruebas preclínicas con animales de laboratorio y a un examen riguroso antes de llegar a probarse en humanos. La mayoría de los medicamentos propuestos no superan esta primera evaluación, y los que sí lo hacen aún tienen que pasar por cuatro fases de ensayos clínicos en voluntarios humanos. En estos ensayos se evalúan aspectos como la toxicidad, efectos secundarios, metabolización, etc. Después de haber superado todos estos pasos el medicamento podrá ser aprobado y comercializarse.

Todo este proceso, desde que se propone el medicamento hasta que se aprueba, puede llevar varios años (www.mdclinical.org). En una enfermedad como la ELA, de rápida progresión y pronóstico fatal, en la cual no existe un tratamiento curativo, resulta interesante buscar medicamentos que hayan sido aprobados para otros usos a fin de agilizar este proceso, conocido como reposicionamiento de fármacos.

En nuestro grupo de investigación se están utilizando este tipo de estrategias para intentar llevar el tratamiento a los enfermos de forma más rápida. En particular se está investigando el quimioterápico 5-Fluorouracilo.

2.2.1. Estructura del 5-Fluorouracilo

El 5-fluorouracilo (5-FU) fue desarrollado en los años 50' después de observar que las células de los hepatomas en ratas incorporaban uracilo más rápidamente que las células normales (Longley et al., 2003). Desde entonces el 5-FU ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento del cáncer.

Tiene una estructura similar a las pirimidinas que forman las moléculas de ADN y ARN. Es un análogo del uracilo con un átomo de fluor en lugar de uno de hidrógeno en la posición 5 del anillo. Esta estructura tan similar al uracilo hace que pueda incorporarse en su lugar durante la síntesis de ADN y ARN, llevando a la citotoxicidad y muerte celular (Zhang et al., 2008).

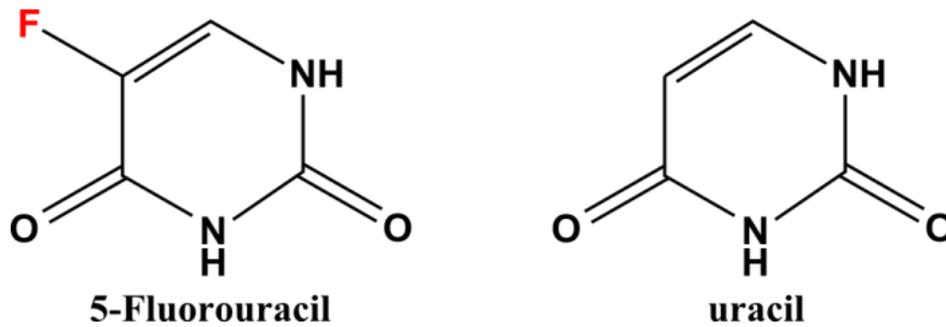


Figura 2: Estructura química del 5-Fluorouracilo y del uracilo (Zhang et al., 2008).

El 5-FU actúa principalmente sobre células de división rápida, por eso es útil para el tratamiento de neoplasias, principalmente las de crecimiento rápido, aunque también actúa sobre células normales no tumorales produciendo algunos efectos secundarios indeseables.

2.2.2. Mecanismo de acción del 5-Fluorouracilo

El 80% del 5-FU administrado se degrada en el hígado por la acción de la enzima dihidropirimidin deshidrogenasa (DPD), el otro 20% dará lugar a tres metabolitos activos: fluorodesoxiuridin monofosfato (FdUMP), fluorodesoxiuridin trifosfato (FdUTP) y fluorouridin trifosfato (FUTP). Estos metabolitos activos del 5-FU actúan por tres vías diferentes:

- 1) Inhibición de la timidilato-sintetasa (TS) por el FdUMP
- 2) Incorporación de FdUTP en el ADN celular en lugar de desoxitimidin trifosfato (dTTP)
- 3) Incorporación de FUTP en el ARN celular en lugar de uridin trifosfato (UTP).

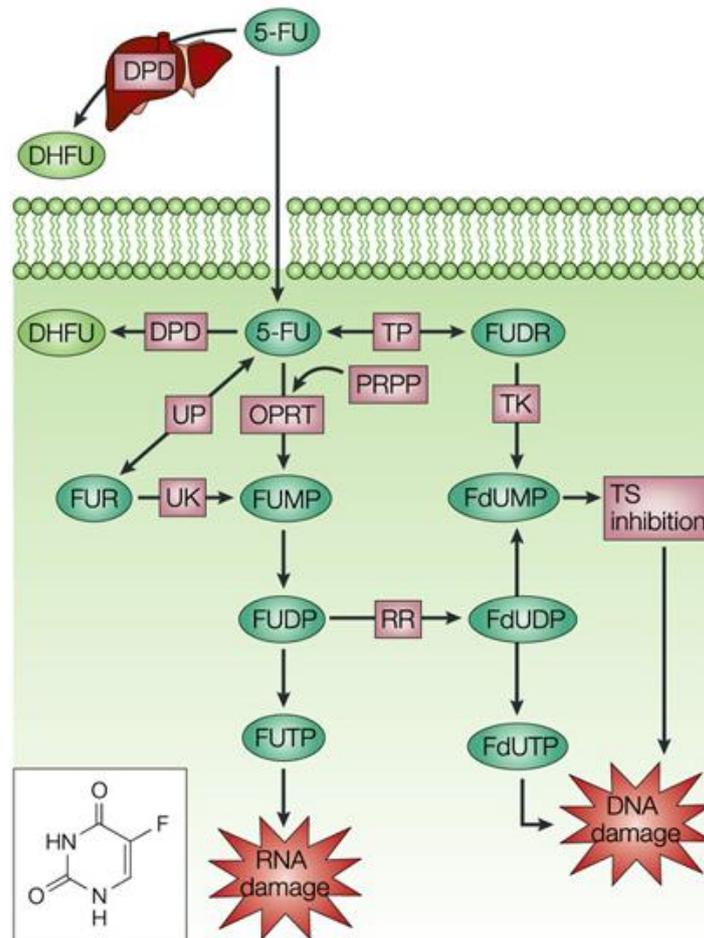


Figura 3: Metabolismo y mecanismo de acción del 5-FU (Longley et al., 2003).

El 5-FU impide la replicación y reparación del ADN

El 5-FU actúa por inhibición competitiva de la enzima timidilato-sintetasa, desplazando al sustrato natural y bloqueando la síntesis de desoxitimidina monofosfato (dTMP). Cuando esta reacción se produce de forma normal proporciona la única fuente *de novo* de dTMP, que se transforma en desoxitimidina trifosfato (dTTP), necesario para la replicación y reparación del ADN (Longley et al., 2003).

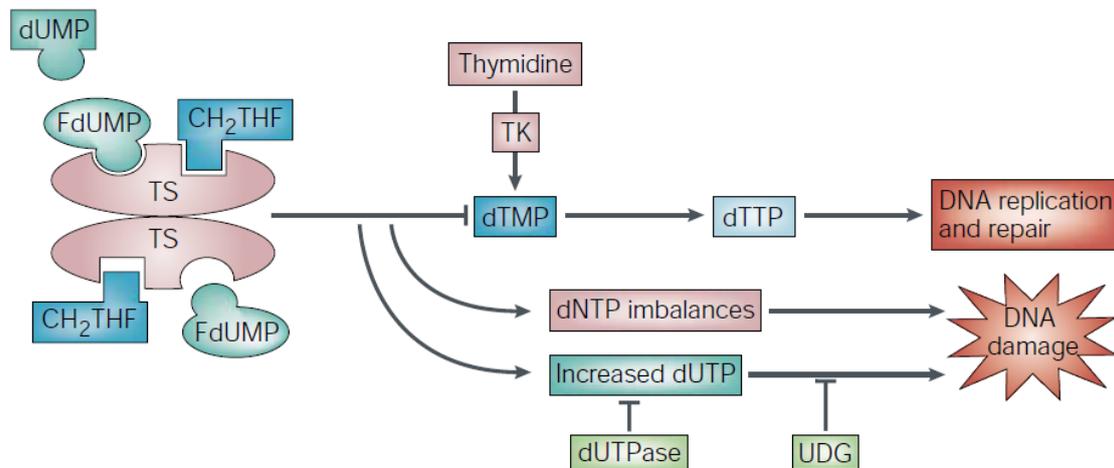


Figura 4: Mecanismo de inhibición de los metabolitos del 5-FU sobre la enzima TS y su consecuencia sobre el ADN (Longley et al., 2003).

El 5-FU se incorpora al ADN y ARN produciendo daños irreparables

Otro mecanismo de acción de los metabolitos activos del 5-FU es la incorporación del FUTP al ARN y del FdUTP al ADN.

Cuando el FUMP se incorpora al ARN altera el normal procesamiento y función del mismo. La incorporación del FUMP resulta tóxico para el ARN a varios niveles: inhibe el procesamiento de pre-ARNr a ARNr maduro, altera la modificación post-transcripcional del ARNt y el ensamblaje y actividad de los complejos ARNsn/proteína, lo que inhibe la unión del pre-ARNm. El 5-FU puede interrumpir muchos aspectos de procesamiento del ARN, dando lugar a profundos efectos en el metabolismo celular y la viabilidad (Longley et al., 2003).

En el ADN no existe la base nitrogenada uracilo, el metabolito activo del 5-FU se incorpora en lugar de la base nitrogenada pirimidínica Timina. Como se ha explicado anteriormente con la inhibición de la enzima TS no se sintetiza dTMP. Esto además de impedir la síntesis de dTTP, y la reparación y replicación del ADN tiene otras consecuencias. La falta de dTTP induce un desequilibrio en la proporción de bases nitrogenadas, e influye en los niveles del resto de desoxinucleótidos (dATP, dGTP y dCTP) a través de varios mecanismos de retroalimentación. Por otra parte, la inhibición

de la TS provoca la acumulación de dUMP, y el consecuente aumento de dUTP. Este dUTP más el metabolito activo del fármaco FdUTP se incorporan de forma aberrante al ADN. Por estos dos mecanismos se produce un daño irreparable en el ADN (Longley et al., 2003).

2.2.3. Efectos del 5-Fluorouracilo sobre la médula ósea

Las células sanguíneas maduras en los adultos están en continua renovación. La médula ósea es el sitio principal donde se produce la formación de nuevas células sanguíneas, proceso denominado hematopoyesis. En la médula ósea se encuentran las células madre pluripotentes, que son células capaces de dar origen a cualquiera de las células sanguíneas y de mantener su propia existencia por divisiones mitóticas (Geneser, 2000). Parte de estas células presentan alta tasa de división, lo que las hace especialmente sensibles a algunos fármacos utilizados en el tratamiento de neoplasias, cuyo objetivo es precisamente atacar a células de división rápida. El 5-FU se encuentra entre los fármacos utilizados con esta finalidad (Aispuru et al., 2006a y 2006b).

Varios estudios han demostrado que después del tratamiento con este fármaco se produce un efecto negativo sobre la celularidad y la viabilidad de las células de la médula ósea. En cuanto a la viabilidad, la mayor mortalidad de células aparece dentro de las 24 primeras horas después de la administración del fármaco. Este efecto negativo es más pronunciado cuanto mayor es la dosis de 5-FU. Dentro del rango de dosis utilizadas habitualmente la viabilidad vuelve al valor previo al tratamiento sobre el día 10 post-administración, aunque tarda más tiempo cuando la dosis de fármaco es mayor. La celularidad en la médula ósea alcanza su mínimo entre los días 3 y 4 después de haber administrado el fármaco, posteriormente se recupera de forma constante hasta alcanzar el máximo alrededor de los 20 días después de la administración. Con una dosis alta de 5-FU se observó un estado cercano a la aplasia de la médula ósea. Se vio también que el número de mitosis es nulo entre los días 1 y 3, y luego aumenta muy por encima de los niveles previos a la administración del fármaco, haciendo posible de este modo que se recupere el número de células normal (Aispuru et al., 2006a).

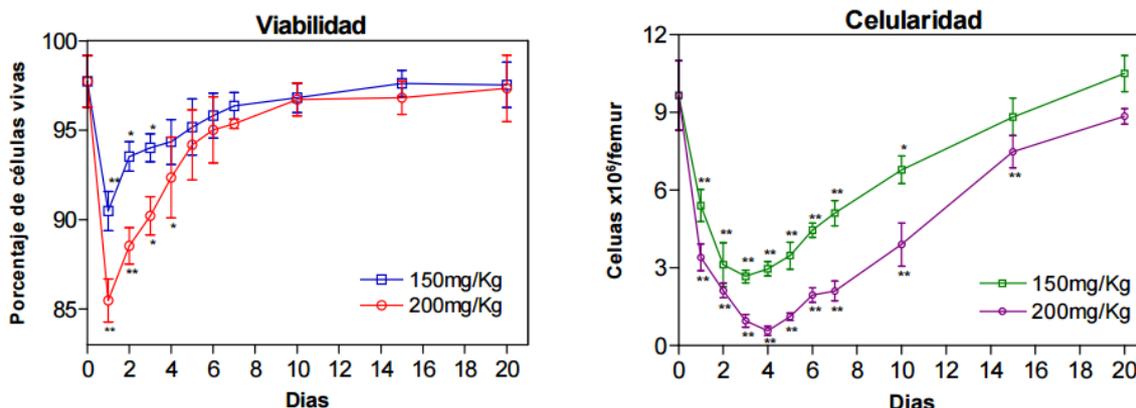


Figura 5: Efecto de diferentes dosis de 5-FU sobre la celularidad y la viabilidad de las células de la médula ósea (Aispuru et al., 2006a).

Este efecto está relacionado con el mecanismo de acción del 5-Fluoracilo que produce un daño irreparable en el DNA inhibiendo la división celular.

2.2.4. Toxicidad y efectos secundarios

El efecto del 5-FU en médula ósea tiene como consecuencia anemia, trombocitopenia y neutropenia. Esta última implica un estado de inmunosupresión y es el factor limitante a la hora de elegir la dosis de 5-FU (Djazayeri et al., 2005). Un efecto similar al que se produce en la médula ósea ocurre en el bazo, donde el 5-FU ejerce un efecto tóxico principalmente sobre las células linfoides, pero también sobre las células eritroides y mieloides (Lettieri et al., 2006). Se han descrito también pericarditis y alteraciones en la función cardíaca como efecto adverso del 5-FU, aunque se desconoce el mecanismo involucrado. En cuanto a la toxicidad neurológica, el 5-FU está incluido entre los quimioterápicos con alto potencial neurotóxico, produce sobre todo disfunción cerebelosa y ocasionalmente su toxicidad puede ser irreversible (Ferreiro et al., 2003).

Se desconoce si el 5-FU tiene algún efecto tóxico o de otro tipo sobre las células musculares esqueléticas, ya que no existe ningún estudio publicado sobre el tema.

2.2.5. Uso del 5-Fluorouracilo en el tratamiento de la ELA

Nuestro grupo de investigación comprobó que uno de los fármacos utilizados para la movilización de células de la médula ósea, Neulasta incrementaba la supervivencia y capacidades motoras del modelo murino para ELA, SOD1^{G93A}. No obstante además de movilizar las células, dicho compuesto también había sido propuesto como neuroprotector (Rando, 2015). Con el fin de conocer cuál de los dos efectos era el que producía la mejora en los animales, se planteó utilizar un medicamento con efecto contrario a Neulasta en las células madre hematopoyéticas. Como se ha explicado previamente, el efecto negativo sobre la celularidad de la médula ósea que tiene el 5-FU es conocido desde hace tiempo y por tanto se debería de observar una menor supervivencia de los animales. Por tanto se diseñó un ensayo preclínico utilizando los ratones positivos a la mutación SOD1^{G93A}, en el cual se les administraron tres inyecciones de 5-FU a una dosis de 150 mg/Kg, con 15 días de diferencia entre cada una, y comenzando a los 70 días de vida del animal. Al grupo control se le administró suero salino fisiológico. Los resultados obtenidos demostraron que el 5-FU aumentaba significativamente la supervivencia de los ratones, y en las pruebas de comportamiento se observaba una mejora significativa en los síntomas motores con respecto al grupo control (Rando, 2015). Ante este resultado tan sorprendente, el ensayo preclínico se volvió a realizar observando los mismos resultados, patentando dicho fármaco en su uso para el tratamiento del ELA.

El mecanismo por el cual el 5-FU interviene en la evolución de la enfermedad es desconocido y es muy importante conocer el mecanismo de acción del fármaco para que la empresa farmacéutica se interese. Hay varias hipótesis que intentan justificar este efecto positivo del fármaco.

La primera hipótesis está relacionada con los agregados de la proteína SOD1 mutada mal plegada, que se forman en el modelo animal utilizado (mutación G93A), y en parte de los enfermos de ELA que presentan alguna mutación en el gen SOD1. Se ha descrito que el 5-FU por su estructura química sería capaz de estabilizar la estructura de la proteína SOD1. Basándose en esto, Airey y colaboradores diseñaron un experimento en el que células en cultivo que expresaban la proteína mutada se trataron con 5-FU. Posteriormente, al medir la cantidad de agregados de proteína SOD1 mutada, se observó

que había una disminución de los mismos con respecto a los animales no tratados. Según estos investigadores, el 5-FU estabilizaría la proteína SOD1, impediría que este cambio en la estructura tridimensional de las proteínas se propague por un mecanismo prion-like, que se cree que existe en la ELA (Airey et al., 2014).

Otra hipótesis, atribuye el beneficioso al efecto del 5-FU sobre el sistema inmunológico. La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad de etiología desconocida pero con un reconocido componente autoinmune, su tratamiento se basa principalmente en administrar agentes inmunosupresores o inmunomoduladores. En pacientes con EM que también han desarrollado algún tipo de cáncer y han sido tratados con citostáticos, como por ejemplo el 5-FU, se ha visto que además de los efectos sobre el cáncer había una mejoría en los síntomas de la EM. El tratamiento con citostáticos a dosis bajas podría ser una opción terapéutica en esta enfermedad. Como se ha mencionado anteriormente que en la ELA la respuesta inmune y la inflamación parecen contribuir al daño en las neuronas motoras (Santos-García et al., 2009).

La tercera y última hipótesis, está relacionada con los efectos que tiene la uridina como neuroprotector. La uridina es un nucleósido formado por la base nitrogenada uracilo enlazada a un anillo de ribosa. Se ha demostrado que la administración de uridina en ratones SOD1^{G93A} aumenta significativamente la supervivencia y mejora el comportamiento motor. Se cree que esto es debido a que la uridina contrarresta en parte los defectos en el metabolismo energético que aparecen en la ELA (Amante et al., 2010). Como resultado del metabolismo del 5-FU se obtienen tres metabolitos activos: fluorodesoxiuridin monofosfato, fluorodesoxiuridin trifosfato y fluorouridin trifosfato. Es posible que estos metabolitos activos que contienen uridina, puedan tener algún efecto similar en el metabolismo energético. Además de esto se ha observado *in vitro* que la uridina es capaz de reducir la formación de agregados proteicos (Airey et al., 2014).

3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Máster es conocer las posibilidades del 5-FU para el tratamiento en la Esclerosis Lateral Amiotrófica, investigando su mecanismo de acción e incrementando su eficacia en los modelos animales de SOD1^{G93A}.

Para la consecución de este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Comprobar el efecto del 5-FU sobre las células hematopoyéticas de la médula ósea de los ratones SOD1^{G93A}.
- Evaluar el efecto de la administración continuada a lo largo de toda la vida del animal de 5-FU a una dosis de 150 mg/Kg sobre la supervivencia y el comportamiento motor del modelo animal SOD1^{G93A}.
- Establecer el efecto de la administración de 5-FU sobre los agregados de proteína SOD1 mal plegada y de la reacción microglial en la médula espinal de los ratones SOD1^{G93A}.

4. METODOLOGÍA

4.1. Animales

Para la realización de los experimentos descritos en este trabajo se utilizaron ratones SOD1^{G93A}, modelo de Esclerosis Lateral Amiotrófica. Se trata de animales transgénicos de alta copia para el gen humano SOD1 con la mutación G93A (sustitución de glicina por alanina en el codón 93), con fondo genético de la B6SJL, obtenidos de la casa comercial *The Jackson Laboratory*.

Los animales fueron alojados en el animalario del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Zaragoza, con alimentación y agua de bebida *ad libitum* y cumpliendo con la normativa española de Bienestar Animal. Los procedimientos y experimentos llevados a cabo en este trabajo fueron aprobados por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

4.2. Genotipado

Para la identificación de los ratones transgénicos dentro de cada camada se utilizó la técnica de PCR sobre una muestra de DNA obtenido de la cola de cada animal. Mediante la amplificación simultánea de un fragmento del gen SOD1 humano mutado y el gen Interleukina 2, y la visualización posterior de los productos en un gel de agarosa, se diferenciaron los animales positivos a la mutación de los *wild-type*.

4.3 Administración de 5-Fluorouracilo

Para los experimentos de este trabajo se utilizó 5-Fluorouracilo (Sigma-Aldrich) disuelto en suero fisiológico. La dosis administrada a los animales fue de 150 mg/Kg de peso vivo, por vía intraperitoneal. Los ratones fueron pesados justo antes de la inyección para ajustar el volumen según su peso. Se siguió el mismo procedimiento con los animales del grupo control, pero en lugar de fármaco se inyectó suero salino fisiológico.

En el experimento en el que se pretendía evaluar el efecto del 5-FU sobre sangre y médula ósea, el fármaco se administró a los ratones con 70 días de edad, solo una vez antes de la toma de muestras, a excepción de los ratones de día 0 a los que no se les

inyectó. Se utilizaron 16 animales SOD1^{G93A}, con sexos balanceados. Para para punto de la gráfica los valores fueron obtenidos de la media de los resultados de 4 animales (días 0, 4, 14 y 20).

En el experimento en el que se quería evaluar el efecto del tratamiento con 5-FU sobre la supervivencia y síntomas motores, el fármaco se administró una vez cada 15 días, desde los 70 días de edad hasta la muerte de los animales. Se utilizaron 32 animales SOD1^{G93A}, con sexos balanceados, separando hermanos de camada entre los diferentes grupos, y se pesaron los animales antes de formar los grupos para que la media de los pesos también fuera lo más homogénea posible. Se dividieron de este modo en grupo tratados con 5-FU, y grupo control.

En el caso del estudio preliminar sobre los agregados proteicos de SOD1 mal plegada, para que la muestra fuera lo más homogénea posible se utilizaron dos ratones machos, hermanos de camada a los que se les administraron inyecciones a los 70, 85 y 100 días de vida. En uno de ellos las inyecciones eran de 5-FU (150 mg/Kg), y en otro de suero salino fisiológico.

4.4. Extracción y procesamiento de muestras

4.4.1. Extracción de sangre y médula ósea

Se realizaron extracciones seriadas de sangre y médula ósea con el objetivo de observar la evolución de los parámetros sanguíneos y los cambios en las poblaciones celulares en los días posteriores a la administración del 5-FU. Se utilizaron animales con 70 días de edad, y se tomaron muestras a ratones sin tratar (día 0), y a otros 4, 14 y 20 días después de haber sido tratados con el fármaco.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante inhalación de dióxido de carbono (CO₂) con 4 horas de ayuno previo. Inmediatamente después del sacrificio se realizó la extracción de sangre por punción intraventricular. Se utilizó una jeringa con aguja de 23G, la sangre fue recogida en un tubo con EDTA y conservada en frío. Estas muestras fueron enviadas a la División de Terapias Innovadoras en Hematopoyesis de la Unidad de Diferenciación y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid para su análisis. Los parámetros estudiados fueron: glóbulos blancos/ml, linfocitos/ml,

granulocitos/ml, monocitos/ml, glóbulos rojos/ml, volumen corpuscular medio, porcentaje de hemoglobina y hematocrito.

La médula ósea se extrajo de los dos fémures de cada ratón mediante flushing por el canal medular de 1 ml PBS con BSA al 1%, utilizando una jeringa con aguja de 21G. Posteriormente se resuspendió cuidadosamente el producto obtenido para separar las células sin lisarlas.

4.4.2. Recuento en cámara de Neubauer

De las muestra de médula ósea se separaron 100 μ l para realizar recuentos en cámara de Neubauer. Para que fuera posible el recuento celular se diluyó la muestra con 900 μ l de PBS con BSA al 1%.

Para el cálculo de la celularidad (células de la serie blanca), se realizó una dilución 1:1 de parte de la muestra con Buffer de lisis de eritrocitos (Sigma), se dejó actuar 15 min y posteriormente se realizó el recuento.

Para evaluar la viabilidad de la serie blanca se realizó una dilución 1:1 de parte de la muestra con Buffer de lisis de eritrocitos, y después de dejar actuar el buffer los 15 minutos necesarios, se realizó otra dilución de esta mezcla 1:1 con Trypan blue (Sigma-Aldrich), finalmente se realizó el recuento. En células vivas con la membrana plasmática intacta el Trypan blue no puede penetrar en el interior. Por el contrario en células muertas o con la membrana dañada, el colorante entra en su interior tiñéndola de azul.

4.4.3. Tinción del frotis de médula ósea

Los restantes 900 μ l de muestra de médula ósea se concentraron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, se colocó una gota de la muestra concentrada en un portaobjetos y se realizó una extensión de la misma. Posteriormente fue teñida con la técnica del panóptico rápido (Everest), para la visualización y la diferenciación de líneas celulares. Finalmente se realizó una valoración cualitativa de los frotis mediante microscopio óptico.

La técnica del panóptico rápido consiste en sumergir la muestra en tres cubetas líquidas diferentes. El primero es una solución fijadora que contiene metanol, el segundo es el colorante ácido Eosina (rojo), y el último es el colorante básico Thiazina (azul). El portaobjetos con la extensión se sumerge 5 segundos en cada una de las cubetas y al final se aclara con agua para retirar los restos de colorantes.

4.4.4. Extracción de médula espinal

A los 105 días de edad fueron anestesiados con pentobarbital sódico se realizó la técnica de perfusión *in vivo* con el fin de obtener una muestra de médula espinal y poder realizar posteriormente cortes de la misma conservando su estructura lo mejor posible.

La técnica de perfusión consiste en colocar al ratón previamente anestesiado en decúbito supino, sujetar las extremidades, y cortar la piel y las costillas para dejar expuesto el corazón. A continuación se inserta la aguja conectada al aparato de perfusión, en el ventrículo izquierdo, se profundiza hasta alcanzar la Aorta y se deja allí la aguja. Se hace un pequeño corte en la aurícula derecha para permitir la salida de los líquidos en la circulación de retorno. La bomba de perfusión se activa haciendo que salga por la aguja primero PBS o solución salina un mínimo de 10 minutos, y a continuación la solución fijadora (paraformaldehído al 4%). Una vigorosa contracción muscular indica que los tejidos ya están correctamente fijados. En este momento se puede retirar la aguja y proceder a la toma de muestras (CEEA, 2007).

De cada ratón se extrajo el segmento lumbar de la columna vertebral, que fue colocado en paraformaldehído al 4% y enviado a la Universidad de Lérida.

4.4.5. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se realizó en colaboración con el Grupo de Patología Neuromuscular Experimental del Instituto de Investigación Biomédica de Lérida perteneciente a la Universidad de Lérida.

La técnica de inmunofluorescencia se llevó a cabo sobre las muestras de médula espinal enviadas. Se utilizaron los anticuerpos Iba1 y AJ10. Iba1 se une a la microglía activada (Rando, 2015), y AJ10 se une a los agregados de proteína SOD1 mutada, pero no a la proteína SOD1 normal (Sábado et al., 2013).

Los cortes de la médula espinal de los ratones se incubaron primero con los anticuerpos primarios Iba1 o AJ10 y posteriormente con los anticuerpos secundarios correspondientes unidos a fluoróforos para permitir su visualización en el microscopio de fluorescencia. La cuantificación de la fluorescencia se llevó a cabo mediante programas informáticos. En el caso del anticuerpo AJ10 la cuantificación de cuerpos neuronales y fibras nerviosas se realizó por observación directa con microscopio de fluorescencia. De cada animal se analizaron 3 muestras diferentes.

4.5. Pruebas de comportamiento

4.5.1. Peso

En el experimento en el que se administraron tres inyecciones de 5-FU los animales se pesaron una vez a la semana antes de realizar las pruebas de comportamiento, y justo antes de la inyección para ajustar el volumen de fármaco necesario según el peso del animal. En el siguiente ensayo, en el que se administró el 5-FU una vez cada 14 días, el peso de los ratones se registró dos veces a la semana. Para realizar la medición del peso se utilizó una balanza electrónica.

4.5.2. Test de la rejilla

La prueba de la rejilla permite determinar la fuerza muscular del animal y observar cuándo comienzan los síntomas de la enfermedad. Consiste en colocar al ratón sobre una rejilla y luego girarla 180°, de manera que el animal quede suspendido en el aire sujetándose de la rejilla por sus extremidades. La prueba acaba cuando el animal alcanza los 180 segundos y como máximo se le dan tres oportunidades para hacerlo. En caso de no alcanzar ese tiempo se registra el mayor de los tres obtenidos. Esta prueba se hizo semanalmente, desde la semana anterior al comienzo del tratamiento hasta la muerte de los animales.

4.5.3. Test del rotarod

El test del rotarod tiene como objetivo de evaluar la coordinación motora, la fuerza muscular y el equilibrio. Consiste en colocar al animal sobre una barra cilíndrica que gira a velocidad constante. El ratón debe caminar sobre esta barra durante 180 segundos sin caerse. Se le dan tres oportunidades para alcanzar el tiempo máximo, y en caso de no

hacerlo se registra el mayor de los tres. El test del rotarod se realizó semanalmente, desde la semana anterior a la primera administración del 5-FU hasta la muerte del animal.

4.5.4. Supervivencia

El avance de la enfermedad tiene como consecuencia la parálisis del ratón, de manera que es incapaz de valerse por sí mismo, situación que es incompatible con el bienestar animal. Se establece como punto final en la vida del ratón el momento en el cual al ser colocado en decúbito supino después de 30 segundos no es capaz de darse la vuelta por sí mismo. En este punto se procede al sacrificio en una cámara de CO₂ y se registra la fecha.

4.6. Análisis de los datos y estadística

Para el análisis de los datos y las representaciones gráficas se utilizaron los programas Excel de Microsoft Office y GraphPad Prism 5. Las pruebas utilizadas para establecer la significación estadística fueron, para la supervivencia y el comienzo de los síntomas, el test Mantel-Cox, y para las pruebas de comportamiento la prueba t-student normalizada. La significación estadística se estableció para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este apartado será dividido en tres subapartados, coincidiendo cada uno de ellos con cada uno de los objetivos específicos planteados en este trabajo.

5.1. La aplicación de 5-FU produce inmunodepresión en ratones SOD1^{G93A}

Se ha descrito en estudios previos que el sistema inmune y la inflamación están involucrados en la patogenia de la ELA. En ratones no transgénicos se ha visto que el 5-FU produce inmunosupresión, disminuyendo el número de precursores sanguíneos en medula ósea y de células blancas en sangre periférica (Aispuru et al, 2006; Randall y Weissman, 2013). Una de las posibles hipótesis para explicar el efecto beneficioso del 5-FU sobre el modelo animal de ELA, era que al disminuir el número de células involucradas en la respuesta inmune, evitaría en parte que estas intervengan en la progresión de la enfermedad. Nos interesó estudiar sí, como ocurre en los animales no transgénicos, en los animales modificados genéticamente, y en concreto en los ratones SOD1^{G93A}, esta disminución también se producía.

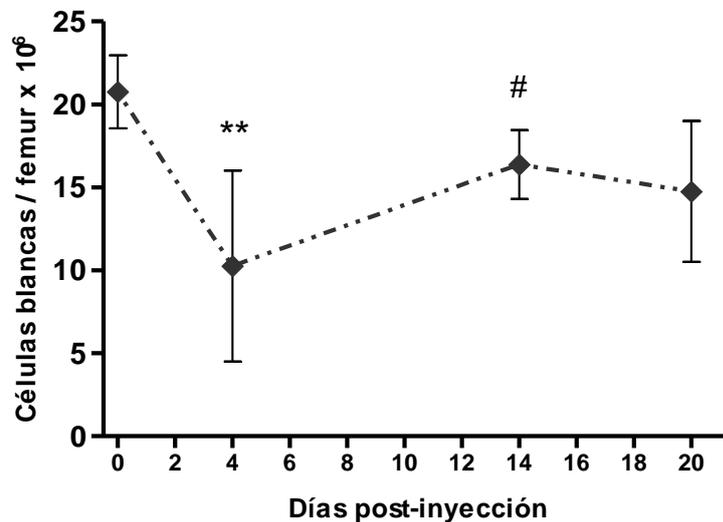


Figura 6: Celularidad (células blancas) en la médula ósea después del tratamiento con 5-FU a lo largo del tiempo (n=16).

Los resultados mostraron que en la médula ósea se produce un descenso abrupto de la celularidad (células de la serie blanca), con un mínimo alrededor del día 4 después del tratamiento con el 5-FU. Este mínimo alcanzado resulta significativamente menor que el valor de células blancas inicial ($p < 0,05$). A partir del cuarto día después de la administración, la celularidad comienza a aumentar hasta el día 14. El nivel alcanzado el día 14 post-inyección resulta significativamente superior que el nivel del día 4, es decir, que a los 14 días post-inyección de 5-FU se logra recuperar la celularidad en la médula ósea (Figura 6).

Estos resultados de la disminución de la celularidad fueron observados también mediante la realización de frotis de médula ósea de los animales correspondientes. Como se observa en la Figura 7, el número de células blancas disminuye drásticamente en el día 4, recuperándose a día 14 post-administración.

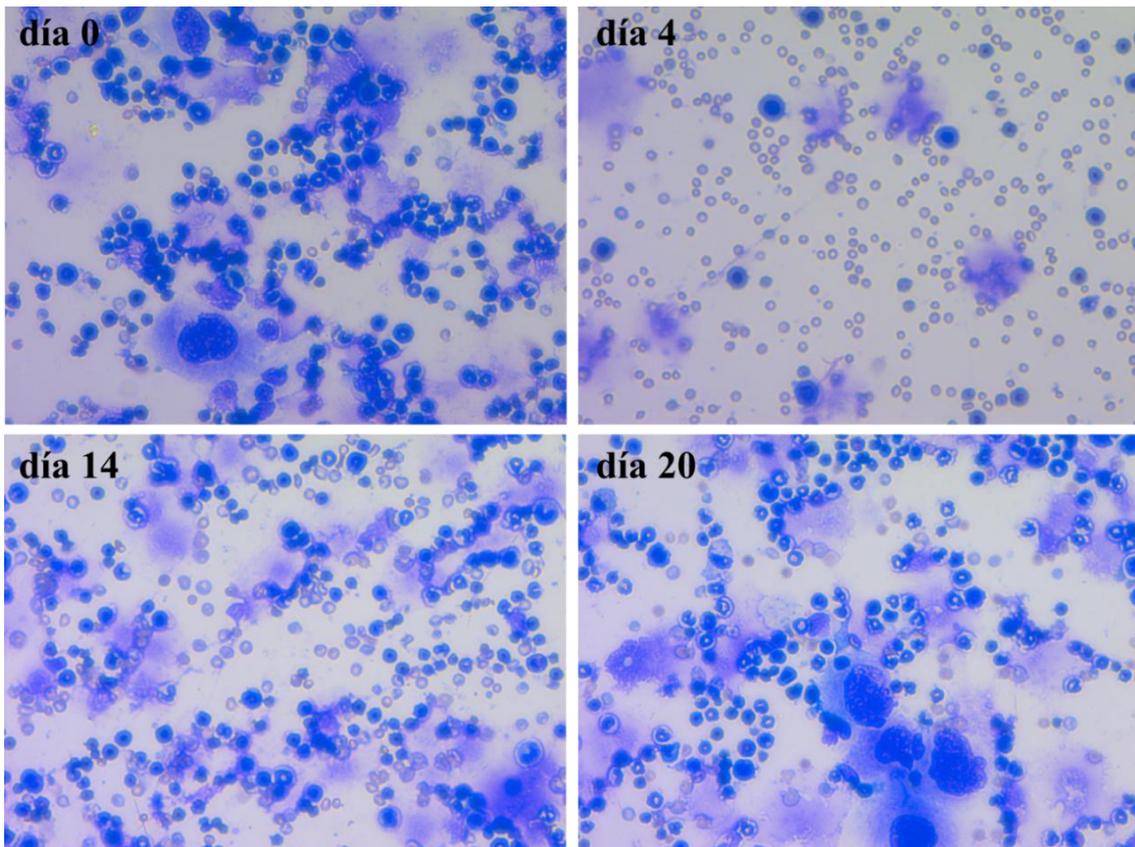


Figura 7: Imagen representativa de los frotis de médula ósea realizados a ratones SOD1^{G93A} sin tratar (día 0) y tratados con 5-FU en los días posteriores a la administración (días 4, 14 y 20) (20x).

La viabilidad en las células de la médula ósea no mostró diferencias significativas en los días posteriores a la administración del 5-FU.

Los resultados correspondientes a los parámetros sanguíneos de estos animales tratados con 5-FU, mostraron una disminución importante en los glóbulos blancos en el día 4 post-inyección, aunque esta disminución no llega a ser significativa con respecto a los valores iniciales ($p=0,07$). Además, esta misma disminución en el día 4 se vio en todos los tipos de células blancas en sangre, tanto linfocitos como granulocitos y monocitos. Respecto a los valores sanguíneos de la serie roja (número de glóbulos rojos, hematocrito, etc.), los valores permanecen casi invariables y dentro de la normalidad en los días posteriores a la administración, en todos los animales analizados.

Los resultados obtenidos en las células de la serie blanca, concuerdan con los de otros autores en animales no transgénicos, que describen una disminución en el número de células blancas, ya sea precursores en la médula ósea como células maduras circulantes en sangre periférica, con un mínimo que se alcanza alrededor de los días 3-4 post-inyección de 5-FU (Aispuru et al., 2006; Randall y Weissman, 2013). Este resultado es interesante ya que existen autores que postulan que el sistema inmune de los animales modificados genéticamente presenta diferencias con respecto al de los animales no modificados genéticamente.

La implicación del sistema inmune en la patogenia de la ELA es un tema que ha sido ampliamente estudiado por los investigadores de la enfermedad, y sobre el que aún existe cierta controversia. Antiguamente, solo se describía el efecto perjudicial de la respuesta inmune sobre el sistema nervioso (Lasiene y Yamanaka, 2011). Sin embargo, en publicaciones recientes se habla de un efecto dual del sistema inmune. Tiene una función neuroprotectora, reparando el daño producido por el avance de la enfermedad, pero en determinados momentos la respuesta inflamatoria producida exacerba el daño producido a las motoneuronas (Zhao et al., 2013; Murdock et al., 2015).

La neuroinflamación parece tener gran importancia en la patogenia de la ELA. Los linfocitos T y las células de la glía, contribuyen al proceso neurodegenerativo. Las células de la glía liberan sustancias citotóxicas que afectan a las motoneuronas causando la muerte por apoptosis (Bucchia et al., 2015). Recientemente se ha descrito que los linfocitos T circulantes son capaces de llegar al encéfalo y parénquima de la médula

espinal, e interactuar con la microglía residente induciendo en ocasiones un comportamiento citotóxico (Evans et al., 2012). El 5-FU al producir una depleción de las células blancas, entre ellas linfocitos, podría frenar en parte este mecanismo patológico.

A pesar de que el sistema inmune, en cierta fase de la enfermedad intervenga provocando un efecto perjudicial, sería inviable anular completamente su acción. Podemos observar en la gráfica de celularidad en médula ósea (Figura 6), que la media en el día 4 post-inyección llega a ser la mitad que el valor inicial, y además presenta una gran variabilidad en los valores. Esto nos indica que con la dosis utilizada de 150 mg/Kg, la celularidad en algunos de los animales alcanza unos niveles muy bajos. Se ha demostrado experimentalmente que una dosis mayor de 5-FU (200 mg/Kg) produce una disminución aún más pronunciada de la celularidad, y como consecuencia de esto la médula ósea tarda más días en volver a los valores normales (Aispuru et al., 2006a). Teniendo en cuenta la variabilidad observada en los ratones no parece conveniente aumentar la dosis de 5-FU, ya que en algunos de ellos podríamos provocar una aplasia de médula ósea, es decir, una eliminación total de los precursores hematopoyéticos, haciendo imposible la producción de células sanguíneas. La disminución de glóbulos blancos en sangre circulante, principalmente la neutropenia, es el principal factor limitante en las dosis de quimioterapia en medicina humana, ya que deja al individuo sin protección ante posibles infecciones.

Curiosamente, a pesar de que en humanos se ha descrito que el 5-FU puede disminuir el número de glóbulos rojos, en los ratones SOD1^{G93A} no se ha observado este efecto secundario. Esto supone una ventaja, ya que en el caso de existir anemia, además de influir negativamente en la salud de los animales, podría afectar los resultados de nuestras pruebas de comportamiento a causa de la fatiga.

La depleción de las células de la serie blanca que se ha observado en el modelo animal SOD1^{G93A} debido a la administración del 5-FU, podría ser responsable del efecto beneficioso que se ha observado después del tratamiento con este fármaco. La disminución de los glóbulos blancos circulantes, especialmente de linfocitos T, evitaría parte del efecto perjudicial que tiene la activación de la microglía responsable de la inflamación.

Ante estos resultados nos propusimos realizar un ensayo preclínico en el que no se incrementara la dosis de fármaco, pero sí el número de administraciones del mismo para intentar mejorar los resultados sobre la supervivencia y la capacidad motora de los animales.

5.2. La administración continuada de 5-FU no mejora la supervivencia ni el comportamiento motor en los ratones SOD1^{G93A}

En vista de los buenos resultados obtenidos con las 3 inyecciones de 5-FU en los ratones SOD^{G93A}, se planteó la inquietud de ver si esos resultados se podían mejorar aún más. Como hemos observado, el efecto de una dosis de 150 mg/Kg de 5-FU en los ratones produce una inmunodepresión importante, por lo no parecía adecuado incrementar la dosis. Con la finalidad de aumentar la cantidad de producto administrado, se planteó la posibilidad de que administrando la misma dosis de fármaco pero en forma continua hasta la muerte del animal los resultados podían ser mejores.

El tratamiento de los ratones SOD1^{G93A} con 5-FU se llevó a cabo desde los 70 días de vida de los animales, administrando el fármaco cada 14 días hasta la muerte, dependiendo del número de días que vivió el animal se administraron entre 4 y 6 dosis.

Considerando como punto de inicio de los síntomas, el primer día en el que al realizar las pruebas de comportamiento el ratón no es capaz de llegar a los 180 segundos en el test de la rejilla. Como se puede observar en la gráfica de probabilidad de inicio de los síntomas según la edad, hay una tendencia a la aparición de los síntomas a edades más tardías en los individuos tratados con 5-FU ($113,9 \pm 2,3$ días), con respecto a los individuos control ($108,3 \pm 2,5$ días) (Mantel-Cox Log-Rank $p=0,2325$), aunque la diferencia entre ambos grupos no resulta significativa ($p>0,05$) (Figura 8).

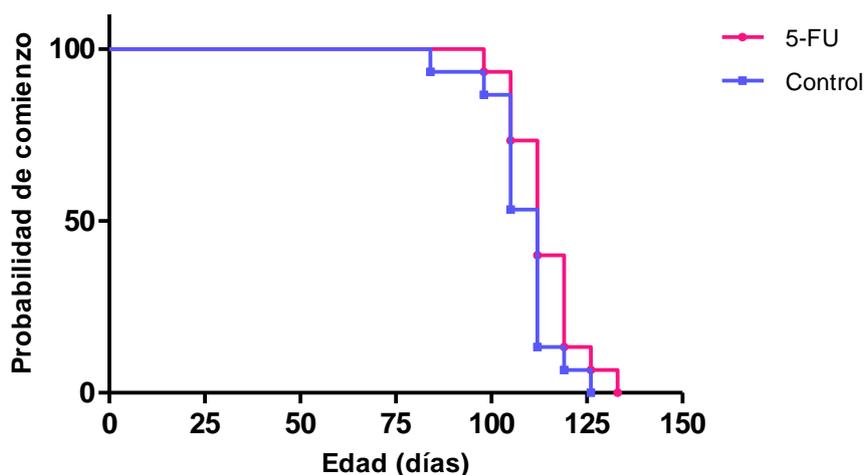


Figura 8: Probabilidad de comienzo de los síntomas según la edad en ratones SOD1^{G93A} tratados con 5-FU y sus controles con solución salina.

Como se observa en la Figura 9, la media de la supervivencia en el grupo control fue $138,1 \pm 2,7$ días y para el grupo tratado una media de $141,3 \pm 2,8$ días (Mantel-Cox Log-Rank $p=0,3441$). A pesar de la tendencia al aumento de la supervivencia en los ratones del grupo tratado con respecto al grupo control, las diferencias no resultan significativas ($p>0,05$).

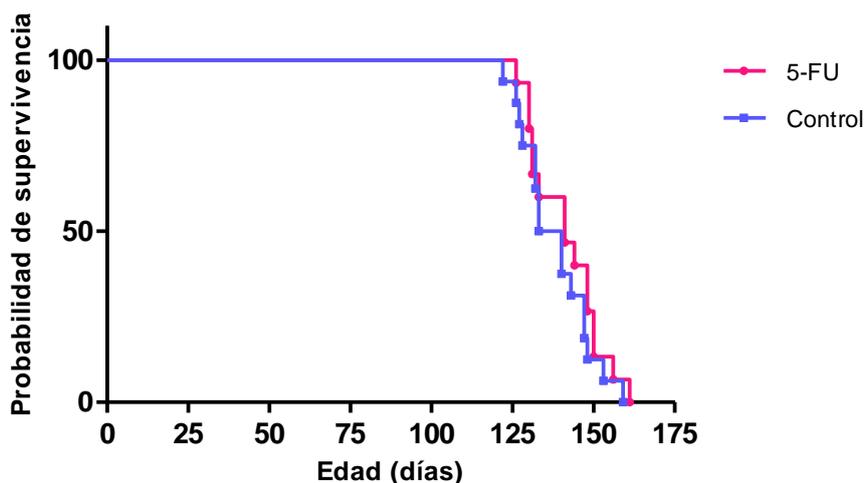


Figura 9: Probabilidad de supervivencia según la edad en los ratones SOD1^{G93A} tratados con 5-FU y sus controles con solución salina.

Los resultados de las pruebas de comportamiento, principalmente el test de la rejilla (A) mostraron una tendencia a la mejora en el comportamiento motor de los animales, aunque las diferencias entre ambos grupos no son significativas ($p>0,05$). A pesar de que existe una tendencia, sobre todo en la prueba de la rejilla a la mejoría en los animales tratados en algunas de las edades estudiadas, las diferencias no llegan a ser significativas, aunque rozan la significancia en algunos puntos, por ejemplo en el día 112 ($p=0,07$).

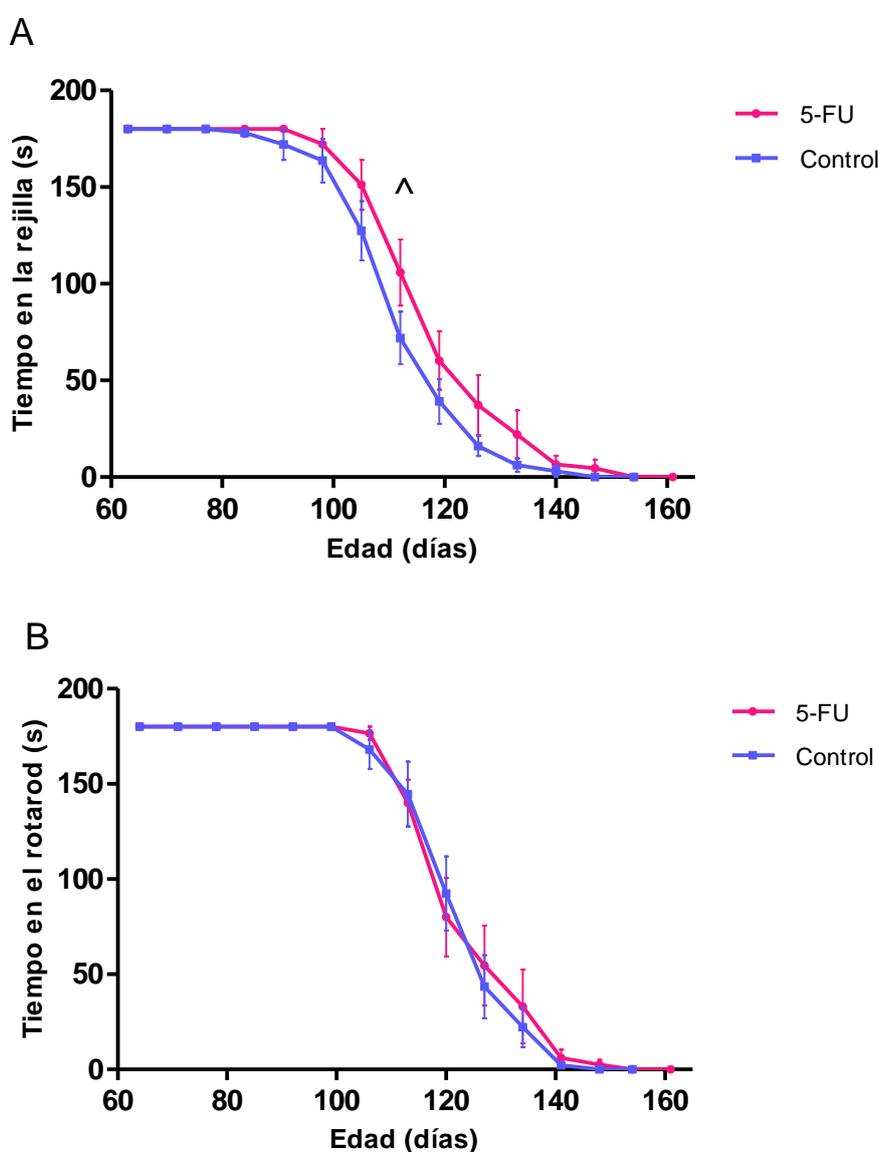


Figura 10: Efecto del tratamiento con 5-FU sobre el comportamiento motor de los ratones SOD^{G93A} evaluado mediante el test de la rejilla (A) y el test del rotarod (B).

En cuanto a la evolución del peso en los animales de ambos grupos las diferencias no son significativas ($p > 0,05$) entre el grupo tratado con 5-FU y el grupo control. Resulta interesante observar principalmente después de las primeras tres inyecciones, cuando la enfermedad aún no está muy avanzada, que la administración del fármaco tiene un efecto negativo sobre el peso de los animales durante los 3-4 días posteriores a la inyección. Esto se corresponde con el momento en el que la celularidad en médula ósea está en el mínimo, y algunos animales muestran cierta apatía.

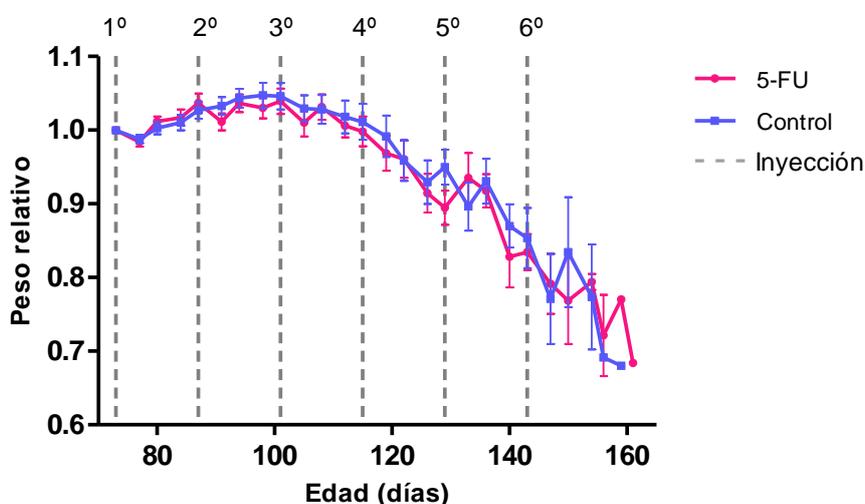


Figura 11: Evolución del peso relativo al primer día de tratamiento en los animales SOD1^{G93A} del grupo tratado con 5-FU y sus controles con solución salina.

En vista de los resultados obtenidos en este último experimento, observamos que la administración continuada de 5-FU en los ratones SOD1^{G93A} no mejora significativamente la supervivencia ni los síntomas motores.

En cuanto a las pruebas de comportamiento motor, el experimento con 3 inyecciones mostraba diferencias significativas en el grupo tratado después de haber administrado todas las inyecciones. Podemos deducir entonces, que la administración del fármaco en estadios más avanzados de la enfermedad, no solo no mejora los síntomas, sino que contrarresta el efecto beneficioso de las primeras inyecciones. En las gráficas de las pruebas de comportamiento las curvas pertenecientes a los animales tratados se

encuentran en niveles superiores alrededor de los días 105-110. Seguramente, si no se hubiese continuado con la administración del 5-FU, es posible que se hubiese observado el efecto beneficioso en los días posteriores.

5.3. La aplicación del 5-FU podría disminuir el número de agregados de SOD1 mal plegada

Otra de las hipótesis para explicar los buenos resultados obtenidos con el tratamiento de 5-FU sobre los ratones SOD1^{G93A}, está relacionada con la acción del fármaco sobre los agregados de proteína SOD1 mal plegada y la activación glial.

Este experimento es el primero realizado *in vivo* para observar el efecto del 5-FU sobre los agregados de proteína SOD1 mal plegada. Como prueba preliminar para medir la cantidad de agregados en la médula espinal se enviaron las muestras a la Universidad de Lérida, ya que los investigadores del grupo del Dr. Esquerda son especialistas en el marcaje de estos agregados. Las muestras pertenecían a dos ratones machos, hermanos de camada, para lograr la mayor homogeneidad posible entre ambos. A uno de ellos se le administraron 3 inyecciones de 5-FU y al otro suero salino fisiológico, posteriormente se realizó la perfusión *in vivo* y se obtuvieron las muestras para realizar posteriormente los cortes de médula espinal.

En la inmunofluorescencia se utilizó el anticuerpo primario AJ10 que es capaz de unirse a las proteínas SOD1 mal plegadas, pero no se une a las que presentan la conformación nativa, y el anticuerpo primario Iba1 que se une a la microglía activada.

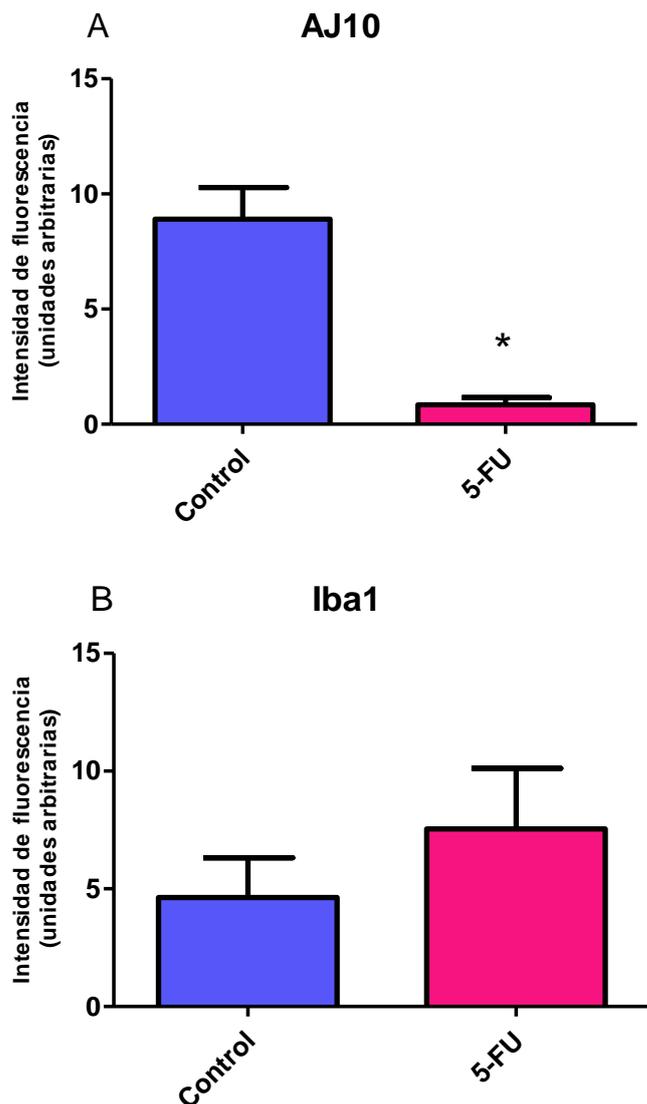


Figura 12: Fluorescencia emitida en el área ventral de la médula espinal de un ratón $SOD1^{G93A}$ tratado con 5-FU y un ratón $SOD1^{G93A}$ control, después del marcaje con anticuerpos AJ10 (A) e Iba1 (B).

En la Figura 12 se observa que el marcaje con AJ10 presenta una intensidad de fluorescencia significativamente menor en el animal tratado con 5-FU. Este marcaje indica que a nivel de médula espinal existe una menor concentración de proteína SOD1 mal plegada en el animal tratado. Esta diferencia de marcaje también se observa en la Figura 13, donde se puede comparar visualmente la fluorescencia emitida por AJ10, marcando los agregados de proteína SOD1 mutada, y el marcaje con Nissl que nos permite localizar las motoneuronas. En la superposición de las dos imágenes (merge), se

puede apreciar que la localización de los agregados coincide con la zona donde se encuentran los cuerpos de las neuronas motoras.

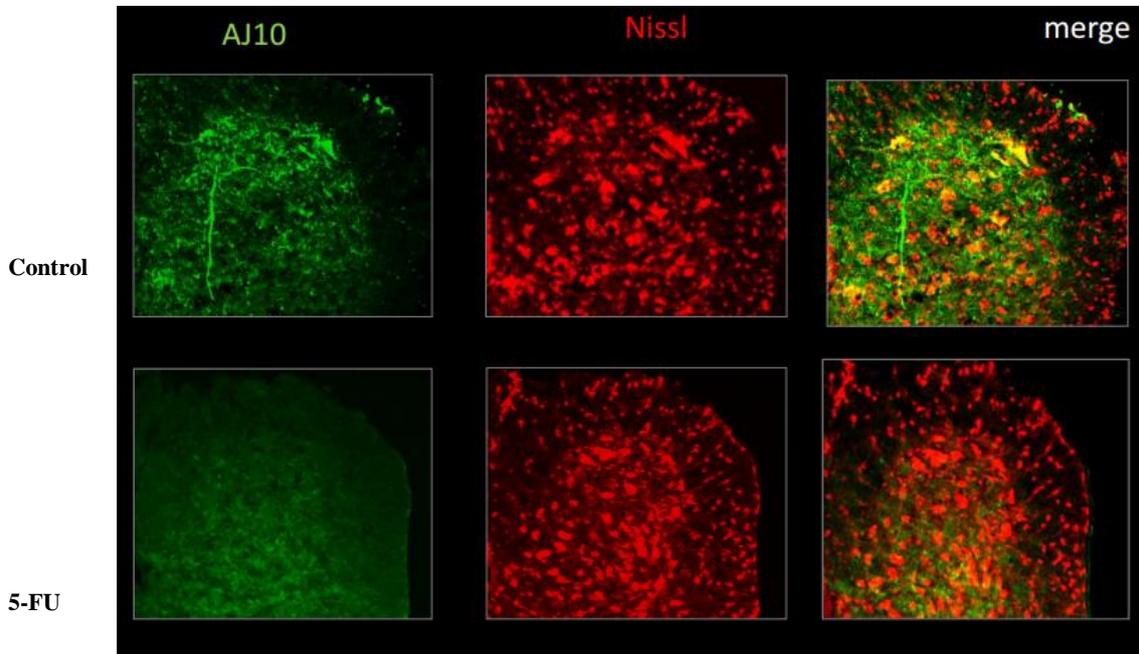


Figura 13: Imágenes del marcaje con anticuerpo AJ10 en la médula espinal de ratones SOD1^{G93A}, y del marcaje con Nissl que permite localizar las neuronas motoras.

En el marcaje con Iba1, se observa una intensidad de fluorescencia más elevada en el animal tratado frente al animal control, aunque las diferencias no resultan significativas. Según este resultado parece haber una tendencia a la activación de mayor cantidad de células de la microglía en el animal tratado con 5-FU. No obstante, estas diferencias no fueron significativas.

A pesar de ser un estudio preliminar, con un número de animales muy pequeño, que actualmente se está incrementando, los resultados obtenidos son de gran interés. El tratamiento con 5-FU parece tener efecto sobre los agregados de proteína SOD1 mal plagada, ya que en el animal tratado hay un marcaje significativamente menor con el anticuerpo AJ10.

También parece haber una correlación negativa entre el marcaje de los anticuerpos AJ10 e Iba1, es decir, que en los animales tratados con 5-FU parece haber menor cantidad de agregados de proteína SOD1 mutada, pero mayor activación de la microglía.

Como hemos mencionado anteriormente la implicación del sistema inmune en la patogenia es un tema de controversia entre los investigadores de ELA. Publicaciones recientes describen poblaciones celulares diferentes entre la microglía. Aunque estructuralmente estas células sean iguales, funcionalmente son diferentes (Nikodemova et al., 2013). Parte de la microglía se activa en un estadio temprano de la enfermedad, e interviene produciendo elevados niveles de sustancias antiinflamatorias y reduciendo la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ejerciendo de este modo un efecto neuroprotector. Otra parte de la microglía se activa en estadios avanzados de la enfermedad liberando sustancias pro-inflamatorias y citotóxicas que contribuyen al daño en las motoneuronas (Zhao et al. 2013; Murdock et al. 2015).

Dada la implicación de las células de la microglía en mecanismos opuestos como son la neuroprotección y la neurotoxicidad, no podemos extraer conclusiones con respecto al significado de la activación de la misma en los animales. Resulta necesario para experimentos próximos incrementar el número de muestras para comprobar si esta diferencia llega a ser significativa, y utilizar marcajes que nos permitan diferenciar entre las subpoblaciones de la microglía.

Discusión general

El 5-FU ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer por su efectividad, a pesar de sus efectos secundarios y su toxicidad, uno de estos efectos es la inmunodepresión que produce dependiendo de la dosis. No obstante administrado en el modelo animal SOD1G93A, se ha observado una mayor supervivencia y capacidad motora de los animales. Es probable que a esa dosis se produzca un inmunosupresión que puede ser favorable para la enfermedad. Estudios realizados en nuestro grupo de investigación han demostrado que el 5-FU administrado en 3 dosis tiene un efecto disminuyendo la neuroinflamación (Ortiz, comunicación personal), este efecto puede deberse a una menor respuesta inflamatoria o a la disminución de la formación de agregados proteicos de la SOD1 mutada.

En este trabajo en el que se ha realizado una administración continuada del fármaco no se ha observado ningún efecto sobre la supervivencia y comportamiento motor de los animales SOD1^{G93A}. La inmunodepresión que produce el fármaco aplicado de forma continuada a lo largo de la vida en los ratones SOD1^{G93A} sería por sí misma, un motivo de reducción de la supervivencia en el grupo tratado y motivo por el cual se había seleccionado en un principio el medicamento para experimentos previos. Sin embargo, este efecto que debería producir una menor supervivencia de los animales, podría verse contrarrestado por otros efectos beneficiosos que el medicamento tuviese en los animales. La disminución en los agregados proteicos producida por el 5-FU, podrían explicar el resultado obtenido.

Actualmente, existen en el mercado análogos y profármacos del 5-FU, por ejemplo Capecitabine, Tegafur, UFT, etc., con menor toxicidad y efectos secundarios, pero igual efectividad (Milano et al., 2004). También se han diseñado terapias combinadas de 5-FU con productos capaces de proteger en parte al organismo de los daños causados de este fármaco, por ejemplo, con Rosiglitazone (Djazayeri et al., 2005). Es importante volver a recordar que en la ELA, una enfermedad en la que las opciones de tratamiento se reducen a un solo fármaco, en algunos casos no efectivo, el reposicionamiento de fármacos es una opción muy interesante.

Esta amplia gama de tratamientos con mecanismo de acción similar al 5-FU que ya están aprobados para su uso en medicina humana, deja un campo abierto para la realización de nuevos ensayos preclínicos. No obstante, son necesarios más estudios para comprender si el efecto del medicamento se basa solamente en la disminución de agregados o la realización de una inmunosupresión leve puede producir también un efecto beneficioso en la patología inflamatoria.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados en el presente estudio, de su discusión y contraste con otras aportaciones, pueden deducirse las siguientes conclusiones:

1. La administración de 5-FU produce una disminución de los precursores de células de la serie blanca en la médula ósea, y de los glóbulos blancos en sangre circulante, sin embargo no altera las células de la serie roja en los ratones SOD1^{G93A}.
2. El 5-FU, agente quimioterápico utilizado ampliamente en el tratamiento del cáncer, administrado en forma continua en el modelo murino SOD1^{G93A} de ELA no retrasa la aparición de los síntomas motores ni aumenta la supervivencia de estos ratones.
3. La aplicación del 5-FU en pacientes de ELA deberá realizarse con precaución por su poder inmunosupresor, análogos y profármacos, que están ya están aprobados para su utilización en medicina humana, con menos efectos secundarios podrían resultar una buena estrategia terapéutica para investigar en un futuro.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aispuru GR, Aquino-Esperanza JA, Lettieri JA, CN, Miño C, Brandan NC. (2006b). Mielosupresión inducida por la quimioterapia con diferentes dosis de 5-fluorouracilo. *Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006.*

Aispuru GR, Aquino-Esperanza, JA, E Lettieri JA, CN, Aguirre MV, Brandan NC. (2006a). Efecto in vivo de diferentes dosis de 5-fluorouracilo sobre la cinética celular de médula ósea murina. *Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006.*

Álvarez-Uría Tejero MJ, Sáiz Ayala A, Fernández Rey C, Santamarta Liébana ME, Costilla García S. (2011). Diagnóstico de la esclerosis lateral amiotrófica: Avances en RM. *Radiología*, 53(2), 146-155.

Amante DJ, Kim J, Carreiro ST, Cooper AC, Jones SW, Li T, Moody JP, Edgerly CK, Bordiuk OL, Cormier K et al. (2010). Uridine ameliorates the pathological phenotype in transgenic G93A-ALS mice. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 11(6): 520-530.

Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, Taynor BG, Eurals Consortium. (2009a). Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotrophic Lateral Sclerosis : Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 10(5-6), 310–323.

Comité Ético de Experimentación Animal del CNB (CEEA) – CSIC (2007). Técnicas de obtención e inoculación de muestras.

Cozzolino M, Carri, MT. (2012). Mitochondrial dysfunction in ALS. *Progress in Neurobiology*, 97(2), 54-66.

Djazayeri K, Szilvássy Z, Peitl B, Németh J, Nagy L, Kiss A, et al. (2005). Accelerated recovery of 5-fluorouracil-damaged bone marrow after rosiglitazone treatment. *European Journal of Pharmacology*, 522(1–3), 122-129.

- Evans MC, Couch Y, Sibson N, Turner MR. (2013). Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 53, 34-41.
- Fernández-Lerones MJ, & de la Fuente-Rodríguez A. (2010). Esclerosis lateral amiotrófica: Un diagnóstico incierto. *SEMERGEN - Medicina De Familia*, 36(8), 466-470.
- Ferreiro J, García JL, Barceló R, Rubio I. (2003). Quimioterapia: Efectos secundarios. *Gaceta Médica De Bilbao*, 100(2), 69-74.
- García Gálvez P, Sebastián Cambón R, Higes Pascual F, Sánchez-Migallón MJ, Yusta Izquierdo A. (2011). Enfermedad de la motoneurona. *Medicine - Programa De Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(77), 5200-5208.
- Geneser F. (2000). Histología. 3ra edición. Ed. Panamericana.
- Grad LI, Fernando SM, Cashman NR. (2015). From molecule to molecule and cell to cell: Prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 77, 257-265.
- Harwood CA, McDermott CJ, Shaw PJ. (2012). Clinical aspects of motor neurone disease. *Medicine*, 40(10), 540-545.
- Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Epidemiology*, 7, 181-193.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 377(9769), 942-955.
- Kumar DR, Aslinia F, Yale SH, Mazza JJ. (2011). Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology. *Clinical Medicine & Research*, 9(1), 46-49.
- Lasiene J, & Yamanaka K. (2011). Glial Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology Research International*, 2011, 718987.

Lattante S, Ciura S, Rouleau GA, Kabashi E. (2015). Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD). *Trends in Genetics*, 31(5), 263-273.

Lettieri CN, Aispuru GR, Aquino-Esperanza J A, Aguirre MV, Brandan NC. (2006). Cambios cualitativos y cuantitativos producidos por dosis diferentes de 5-fluouracilo en células esplénicas. *Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006*.

Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chiò A, Mitchell D, Swingler RJ, Beghi E. (2010). Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 81(4), 385–390.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 3, 330-338.

Marangi G, & Traynor BJ. (2015). Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: New genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges. *Brain Research*, 1607, 75-93.

Murdock BJ, Bender DE, Segal BM, Feldman EL. (2015). The dual roles of immunity in ALS: Injury overrides protection. *Neurobiology of Disease*, 77, 1-12.

Nikodemova M, Small AL, Smith S, MC, Mitchell GS, Watters JJ. (2014). Spinal but not cortical microglia acquire an atypical phenotype with high VEGF, galectin-3 and osteopontin, and blunted inflammatory responses in ALS rats. *Neurobiology of Disease*, 69, 43-53.

Oliván S, Martínez-Beamonte R, Calvo AC, Surra JC, Manzano R, Arnal. (2014). Extra virgin olive oil intake delays the development of amyotrophic lateral sclerosis associated with reduced reticulum stress and autophagy in muscle of SOD1G93A mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(8), 885-892.

Pugdahl K, Fuglsang-Frederiksen A, de Carvalho M, Johnsen B, Fawcett PRW, Labarre-Vila, Liguori RA, Nix WA, Schofield IS. (2007). Generalised sensory system

abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: a European multicentre study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 78(7), 746–749

Quarracino C, Rey RC, Rodríguez GE. (2014). Esclerosis lateral amiotrófica (ELA): Seguimiento y tratamiento. *Neurología Argentina*, 6(2), 91-95.

Rando Zalduendo A. (2015). Terapia celular en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica: trasplante y/o estimulación de células madre endógenas. PhD Tesis. Universidad de Zaragoza.

Redler RL, & Dokholyan NV. (2012). The Complex Molecular Biology of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 107, 215–262.

Robberecht W, Philips T. (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews Neuroscience* 14(4), 248-264.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, *et al.* (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993, 362:59-62.

Rowland LP, Shneider NA. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 344(22), 1688-1700.

Sábado J, Casanovas A, Hernández S, Piedrafita L, Hereu M, Esquerda JE. (2013). Immunodetection of Disease-Associated Conformers of Mutant Cu/Zn Superoxide Dismutase 1 Selectively Expressed in Degenerating Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 72:646-661.

Saleh IA, Zesiewicz T, Xie Y, Sullivan KL, Miller AM, Kuzmin-Nichols N, *et al.* (2009). Evaluation of humoral immune response in adaptive immunity in ALS patients during disease progression. *Journal of Neuroimmunology*, 215(1–2), 96-101.

Santos-Garcia D, Prieto JM, Lema M. (2009). Clinical course of multiple sclerosis in patients treated with cytostatic drugs for cancer. *Revista de neurología* 48(2): 71-74.

Shaw PJ. (2005). Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005, 76:1046-1057.

Tikka TM, Vartiainen NE, Golstein G, Oja SS, Andersen PM, Marklund SL, Koistinaho J. (2002). Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neurone disease. *Brain* 125 (4) 722-731

Wijesekera LC, Leigh PN. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4, 3.

Zhang N, Yin Y, Xu S-J, Chen W-S. (2008). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules* 13(8):1551-1569.

Zhao W, Beers DR, Appel SH. (2013). Immune-mediated Mechanisms in the Pathoprosession of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology : The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 8(4), 888–899

Zoing MC, Burke D, Pamphlett R, Kiernan MC. (2006). Riluzole therapy for motor neurone disease: An early australian experience (1996–2002). *Journal of Clinical Neuroscience*, 13(1), 78-83.