



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: Avances en el estudio de
biomarcadores en la ELA**

Autor: Agatha Elisa Núñez Doyle

Fecha: Febrero 2019

Tutor: Alberto García Redondo

RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad letal neurodegenerativa que afecta mayoritariamente a las neuronas motoras. El método diagnóstico actual está basado en la clínica y esto conlleva un retraso significativo en el establecimiento del diagnóstico adecuado y en el inicio del tratamiento. La utilización de biomarcadores podría contribuir considerablemente al establecimiento temprano de un diagnóstico concreto, al seguimiento de la enfermedad y al entendimiento fisiopatológico de la misma, necesario para el desarrollo de tratamientos efectivos. Se han estudiado varios biomarcadores con potencial diagnóstico y pronóstico, obteniéndose resultados prometedores que indican que podrían revolucionar la práctica clínica, aunque aún hay que resolver algunas dificultades y son necesarios más estudios para completar y validar estos hallazgos.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad que abarca un grupo heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas letales cuya etiología es aún muy desconocida. Forma parte de las enfermedades de la neurona motora y se caracteriza por una degeneración progresiva de las neuronas motoras superiores y/o inferiores del cerebro y de la médula espinal. Esto conduce a una debilidad muscular que, por el carácter progresivo de la degeneración, comienza de manera focal pero se extiende hasta afectar a la mayoría de los músculos y llega a convertirse en parálisis. El inicio de los síntomas suele ser espinal, aunque también puede ser bulbar. Se produce un peor manejo de las manos en el primer caso, problemas en el habla o al tragar en el segundo y en ambos se producen cojera y caídas. Normalmente la muerte ocurre por parálisis respiratoria a los 3-5 años desde el diagnóstico de la enfermedad [1,2,3].

Aunque tradicionalmente se ha considerado que esta enfermedad afecta sólo a áreas motoras, también están implicadas zonas extra motoras. Esto explica los síntomas cognitivos, conductuales y disautonómicos que se pueden producir además de los síntomas de debilidad muscular. Se sabe que aproximadamente un 15-20% de los pacientes de ELA presentan además demencia frontotemporal (DFT) [1,3,4].

La ELA tiene una incidencia de 1-2 personas por cada 100.000 al año. Su prevalencia, reflejando su rápida letalidad, es de 5 casos por cada 100.000 personas, por lo que se clasifica como enfermedad rara [1].

Numerosos genes están implicados en esta heterogénea enfermedad. La mayoría de los casos de ELA ocurren sin transmisión familiar (ELA esporádica), pero un 10% de ellos son heredados (ELA familiar) [3].

En relación con la ELA familiar, se conocen algunas de las mutaciones genéticas indudablemente implicadas en la patogénesis. La más común es la que ocurre en *C9ORF72*, seguida por las mutaciones en los genes *SOD1*, *TARDBP* y *FUS*. Se han propuesto muchos genes que podrían estar asociados con la patogénesis, pero la validación de la causalidad de una mutación específica es muy compleja [1].

La causa de la ELA esporádica es desconocida, aunque en algunos casos se han encontrado mutaciones en genes establecidos de la ELA familiar, como *SOD1* y *C9ORF72*. Una posibilidad es que todos los casos de ELA esporádica presenten, en última instancia, varios determinantes genéticos. También está siendo investigado el posible papel de los factores exógenos en la patogénesis de la enfermedad [1].

Los mecanismos patológicos subyacentes de la ELA son multifactoriales y aún no están completamente determinados. De hecho, queda un largo camino para entender totalmente el mecanismo patogénico. Algunos de los acontecimientos en el ámbito de la célula posiblemente implicados son el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, el daño axonal, la excitotoxicidad, la neuroinflamación y la agregación proteica. Lo que se sabe es que son varios los mecanismos que contribuyen al desarrollo y a la progresión de la ELA [2,3].

La agregación proteica, implicada en la patogenia, da lugar a inclusiones: acumulaciones patológicas de agregados proteicos en el citoplasma. Estas inclusiones son una característica patológica común de la ELA, aunque su composición es variable. El principal componente en la mayoría de los casos es la proteína TDP-43, menos en los casos de mutaciones en *SOD1* y *FUS*, en los que esta proteína no se encuentra en los agregados [1].

Algunas características patológicas están asociadas al gen específico afectado. Otras se encuentran en varios subtipos genéticos de ELA, como las inclusiones de TDP-43 o las asociadas a la neurodegeneración, que ocurre en todos los tipos de ELA, aunque se pueden encontrar de forma diferente en cada subtipo de ELA o enfermedad neurodegenerativa. Son estas características patológicas las que pueden dar lugar a nuevos métodos de diagnóstico y de análisis de progresión.

Actualmente el diagnóstico de ELA está basado en la evaluación clínica, en la evaluación electrofisiológica y en la exclusión de enfermedades similares a la ELA [2]. La certeza del diagnóstico de la ELA se clasifica en distintas categorías basadas en los criterios de “El Escorial”, que valoran la presencia o ausencia de evidencia sintomática, electrofisiológica y de

neuroimagen [2,5]. La progresión se evalúa según el sistema de puntuación “ALSFRS-R”, un cuestionario que mide distintas habilidades de los pacientes [4].

Este proceso diagnóstico es lento y complejo. Primero, el fenotipo de la ELA es muy heterogéneo, habiendo muchas variaciones tanto en la progresión de la enfermedad como en el lugar y el tiempo de aparición de los síntomas. Además, la ELA, sobre todo en fases tempranas de la enfermedad, es muy similar a otras enfermedades. Se produce un intervalo medio de unos 12 meses entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico definitivo e incluso algunos pacientes nunca llegan a tenerlo. Lógicamente, un retraso en el diagnóstico conduce a un retraso en el tratamiento, cuyo inicio temprano da lugar a mejores resultados clínicos. Hay una urgente necesidad de encontrar nuevos métodos de diagnóstico ya que el método actual no solo es lento, retrasando el tratamiento y dificultando el reclutamiento de pacientes y la interpretación de los resultados en los ensayos clínicos, sino que no es eficaz a la hora de diferenciar la ELA de enfermedades con mejor pronóstico o posiblemente tratables. Además, es incompatible con la detección y el diagnóstico de pacientes pre-sintomáticos. La búsqueda y utilización de biomarcadores adecuados tiene el potencial de mejorar considerablemente el proceso de diagnóstico actual y de aumentar la precisión del seguimiento de la enfermedad [2,3,4].

Un biomarcador se define como una característica medida de forma objetiva que indica procesos biológicos normales, patológicos o respuestas a intervenciones terapéuticas. Idealmente, debería presentar elevada sensibilidad, especificidad y poder predictivo, además de otras cualidades como seguridad y accesibilidad, aunque es difícil que un biomarcador reúna todos estos atributos [6,7].

Nos centraremos en los biomarcadores con valor diagnóstico o pronóstico, aunque también existen los predictivos y los farmacodinámicos, más relacionados con el efecto de las intervenciones terapéuticas. Hay que tener en cuenta que un solo biomarcador puede pertenecer a más de una de estas categorías.

Un biomarcador diagnóstico es una característica de la enfermedad relacionada con la presencia o ausencia de un estado fisiopatológico. El hallazgo de biomarcadores diagnósticos específicos y sensibles podría permitir un diagnóstico temprano de ELA, incluyendo el de portadores pre-sintomáticos de mutaciones patológicas, que es cuando el tratamiento sería probablemente más efectivo. Además, podrían tener utilidad en la diferenciación entre ELA y otras enfermedades similares, disminuyendo así el número de casos mal diagnosticados [6].

Los biomarcadores pronósticos son características que aportan información sobre el camino natural de la enfermedad, en ausencia de tratamiento. La estratificación de pacientes según el pronóstico sería muy beneficioso para los ensayos clínicos, ya que aumentaría el poder

estadístico, se reducirían la duración y el coste de los mismos y además se podría estudiar el efecto terapéutico sobre un subgrupo específico de pacientes [6].

Dentro de estos dos tipos de biomarcadores hablaremos de los genéticos y de los encontrados en fluidos biológicos, aunque los de neuroimagen y los electrofisiológicos también presentan potencial y están siendo estudiados de forma muy activa.

En general, el estudio de biomarcadores además podría mejorar nuestro entendimiento de la fisiopatología de la ELA, de los mecanismos subyacentes del proceso de degeneración progresiva y de los distintos fenotipos posibles, que es esencial para la investigación de posibles tratamientos.

La ELA posee similitudes con otras enfermedades neurodegenerativas. Una enfermedad especialmente relacionada con la ELA es la DFT, en la que ocurre una degeneración progresiva en el lóbulo frontal y en el temporal. Como se ha mencionado anteriormente, una parte significativa de los pacientes ELA presentan, además de cambios motores, cambios cognitivos y de comportamiento, que son síntomas asociados con la DFT. Estas dos enfermedades comparten varias características genéticas, patológicas y clínicas, por lo que no es sorprendente que se detecten algunos de los mismos biomarcadores. Esta vinculación pone de manifiesto la posibilidad de que, en realidad, ambas enfermedades formen parte de un continuo patológico degenerativo más amplio [1,8,9].

OBJETIVOS

- Realizar un análisis de los recientes avances producidos en el estudio de posibles biomarcadores diagnósticos y pronósticos de la ELA, en concreto los genéticos y los encontrados en fluidos.
- Evaluar el potencial y las ventajas que ofrecen los mismos frente al método diagnóstico y pronóstico actual, así como sus limitaciones.
- Relacionar los biomarcadores encontrados en la ELA con los de otras enfermedades neurológicas, deteniéndonos especialmente en la comparación con la DFT.

METODOLOGÍA

Revisión bibliográfica de artículos recientemente publicados y encontrados mayoritariamente en la base de datos “PubMed” relacionados con los biomarcadores estudiados en la ELA, la DFT o en enfermedades neurodegenerativas en general. Previamente se estudiaron artículos centrados en lo conocido hasta el momento sobre la fisiopatología de la ELA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. MARCADORES GENÉTICOS

El diagnóstico clínico de ELA puede ser confirmado mediante la detección de mutaciones asociadas con la enfermedad. Las mutaciones que se consideran biomarcadores diagnósticos son las que tienen una relación causal bien establecida con la enfermedad. Otras, sobre todo las menos frecuentes o las de más reciente descubrimiento, aún necesitan más investigación. En algunos de los subtipos de ELA el gen causal no se ha identificado todavía. Cabe señalar que la cantidad de genes considerados factores de riesgo está aumentando constantemente y que prácticamente cualquier alteración genética podría ser susceptible de caracterizarse como un nuevo biomarcador [1,4].

Los genes en los que la relación causal ha sido validada son los siguientes: *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP-43*, *FUS*, *CFAP410 (C21ORF2)*, *CCNF*, *TBK1*, *CHCHD10*, *MATR3*, *TUBA4A*, *HNRNPA1*, *HNRNPA2B1*, *PFN1*, *SQSTM1*, *UBQLN2*, *ATXN2*, *OPTN*, *SPG11 (SPG11S)*, *VCP*, *ANG*, *ELP3*, *CHMP2B*, *VAPB*, *DCTN1*, *ALS2*, *SETX* y *NEFH* [4]. La mutación más común que causa la enfermedad, tanto en la forma esporádica como en la familiar, es la que ocurre en *C9ORF72*. Esta mutación se trata de una expansión de repeticiones de un hexanucleótido: mientras que normalmente este gen contiene un número inferior a 30 repeticiones de GGGGCC en el primer intrón, los portadores de ELA tienen varios cientos de repeticiones de esta secuencia. Las mutaciones en *SOD1* son de tipo cambio de aminoácido o parada temprana de la traducción y corresponden con la segunda causa más común de la ELA familiar, pero representan solo el 1% de los casos de ELA esporádica. Otras de las mutaciones más comunes son las que ocurren en *TARDBP* y *FUS*, que son también mutaciones de cambio de aminoácido [1,4].

La detección de variantes patológicas determinantes de la enfermedad puede permitir la identificación de pacientes pre-sintomáticos, que supone un gran avance para el estudio y el tratamiento de estos pacientes. Actualmente el análisis genético es la única manera de diagnosticar pacientes pre-sintomáticos.

Algunos de estos genes no solo están relacionados con ELA, sino también con otras enfermedades. Debido a la pleiotropía, la misma mutación en un mismo gen puede resultar en distintas enfermedades o fenotipos clínicos. Esto es lo que ocurre en la expansión de repeticiones del hexanucleótido en *C9ORF72*, que puede resultar en ELA, DFT o ambas a la vez. Otra razón por la que relación genotipo-fenotipo a veces no es evidente es la penetrancia

incompleta, esta resulta cuando un genotipo patológico puede expresarse o no expresarse en el fenotipo [6].

Algunas mutaciones tienen implicaciones pronósticas, ya que pueden afectar la progresión de la enfermedad o la supervivencia de los pacientes. Estas mutaciones pueden ser empleadas como biomarcadores pronósticos. Por ejemplo, la mutación *SOD1D90A* se asocia con una mayor supervivencia, mientras que la mutación *SOD1A4V* es responsable de una forma agresiva de la enfermedad y está asociada con una menor supervivencia, al igual las mutaciones 249I/I o V/I en el gen *CX3CR1*. Otro gen estudiado es el gen *EPHA4*, en el que se ha comprobado que la pérdida de función de variantes genéticas resulta en una mayor supervivencia. La expansión de repeticiones en *C9ORF72* se asocia con un mayor riesgo de desarrollar DFT [4,6].

El estudio genético de la ELA, gracias a recientes avances tecnológicos como la secuenciación de alto rendimiento, está en continuo desarrollo y se esperan resultados prometedores. Se obtendrán nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, lo que mejorará la estratificación de pacientes para el diseño de ensayos clínicos e innovadoras estrategias terapéuticas. Se podrán identificar los pacientes susceptibles de terapias genéticas (terapias con oligonucleótidos antisentido o ARN de interferencia) y los factores genéticos que influyen en las respuestas al tratamiento. Además, se podrá identificar a pacientes pre-sintomáticos y adelantar el comienzo de tratamiento. [1,6]. Actualmente, los biomarcadores genéticos son los únicos validados en la práctica clínica. Sin embargo, no es posible realizar un análisis genético a todos los pacientes y además no es aplicable en todos los casos (desconocimiento de muchas mutaciones y de la ELA esporádica).

2. MARCADORES EN FLUIDOS

En los fluidos biológicos de los pacientes de ELA se pueden detectar distintos biomarcadores que provienen de las neuronas motoras degeneradas. Los más usados son el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la sangre.

EL LCR, al estar en contacto directo con el sistema nervioso central (SNC), es una fuente de biomarcadores muy empleada. El problema es que se obtiene mediante una punción lumbar, una intervención invasiva, propensa a efectos secundarios y lenta, por lo que su obtención de forma periódica para estudios longitudinales y para estudios de biomarcadores de progresión no se recomienda y presenta limitaciones éticas [2].

La sangre, por el contrario, es de obtención fácil, rápida y con efectos secundarios mínimos, pero el grado en el que los biomarcadores reflejan patología del SNC no está tan claro. Algunos

biomarcadores que se encuentran en la sangre pueden ser generados por otros tejidos y órganos afectados por la ELA, lo que la convierte en una fuente de biomarcadores de gran potencial, aunque también pueden encontrarse biomarcadores que reflejan otras condiciones fisiopatológicas, pudiendo crear confusión.

Los biomarcadores de mayor interés que se encuentran en estos fluidos son los neurofilamentos, las proteínas DPR, la proteína SOD1, la proteína TDP-43, los microARNs, los biomarcadores inflamatorios y los biomarcadores metabólicos.

A) Neurofilamentos

Los neurofilamentos son proteínas estructurales específicas del citoesqueleto del axón de las neuronas. Son biomarcadores de daño y muerte neuronal ya que, tras estos eventos, se liberan al LCR y a la sangre. Además, su acumulación en neuronas motoras se asocia a una disfunción neuronal [6].

Lo que realmente se usa como biomarcador son dos de las subunidades que componen estos neurofilamentos: la proteína NFL (subunidad ligera) y la proteína NFH (subunidad pesada), esta última en su forma fosforilada (NFHp). Muchos estudios independientes, tanto longitudinales como transversales, y con grandes grupos de pacientes, han descrito el gran potencial de utilización de las proteínas NFL y pNFH en el LCR y la sangre como biomarcadores de la ELA. Además, al indicar neurodegeneración, también se encuentran en fluidos biológicos en otras enfermedades de afectación o degeneración neuronal. Son los biomarcadores más prometedores como indicadores de neurodegeneración [4].

Distintos estudios centrados en los niveles de la proteína NFHp en el LCR han mostrado que estos son mayores en pacientes de ELA que en pacientes con otras enfermedades neurológicas y que en personas sanas. De manera similar, se ha encontrado que los niveles de NFHp en plasma y los de NFL en LCR y sangre también son más altos en los pacientes de ELA. Sin embargo, aunque estos resultados apoyan la capacidad de los neurofilamentos como biomarcadores de diagnóstico diferencial entre la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas, como otras enfermedades de la neurona motora, no han sido uniformes a lo largo de los diferentes estudios [4,6].

Concretamente en el espectro ELA-DFT, en un estudio se detectó que la proteína NFL está aumentada en el LCR tanto en ELA como en DFT y además refleja la gravedad de la enfermedad y el nivel de afectación cognitiva y atrofia cerebral [10]. Se encontraron mayores concentraciones en el grupo de ELA, siendo menores en el grupo de DFT y aún menores en los

controles. Este estudio aporta evidencia de que la proteína NFL es útil para la evaluación de la neurodegeneración frontotemporal y el ritmo de progresión en el espectro ELA-DFT.

Una forma de clasificar las enfermedades de la neurona motora es según si las neuronas afectadas son las superiores, las inferiores, o ambas, como en la ELA. Recientemente, un grupo de investigación realizó un estudio con la hipótesis de que la proteína NFHp podía diferenciar entre los distintos síndromes de la neurona motora superior, como la esclerosis lateral primaria (ELP), que es la ELA con afectación de las neuronas motoras superiores, y la paraplejia espástica hereditaria (PEH) [11]. Encontraron que una limitación de los estudios anteriores había sido la heterogeneidad de las enfermedades similares a la ELA y en lugar de agrupar las enfermedades de la neurona motora inferior y las de la neurona motora superior indistintamente, se centraron solo en las últimas. Se midieron los niveles de NFHp en LCR y suero en pacientes con signos de afectación de las neuronas motoras superiores que luego fueron diagnosticadas de ELP, PEH o ELA. Se encontró que los niveles de NFHp en suero y LCR eran mayores en la ELA que en las otras dos enfermedades. Los niveles en ELP y PEH eran parecidos y mayores que en los controles sanos. Este descubrimiento es muy significativo porque, de los síndromes de la neurona motora superior, se podrían diferenciar los de un pronóstico más favorable, ELP y PEH, de la ELA, que tiene un peor pronóstico.

Se cree que los neurofilamentos no solo tienen potencial para diferenciar la ELA de otras enfermedades, sino que también pueden tenerlo para diferenciar unos subtipos de ELA de otros. Se ha encontrado que los pacientes de ELA con mutación en *C9ORF72* tienen niveles más altos de NFHp que los que tienen otra mutación causal [12]. Esto concuerda con el hecho de que los pacientes de ELA *C9ORF72* desarrollan una mayor atrofia cerebral, particularmente en regiones extra-motoras, que otros pacientes de ELA. Es posible, por tanto, que los niveles de neurofilamentos sean función de la localización o la cantidad de regiones afectadas más que de la mutación patológica.

También se ha estudiado la correlación de los neurofilamentos con la localización clínica de la ELA. Aunque los niveles de neurofilamentos pueden ser función del número de regiones afectadas, con implicación tanto de neuronas motoras superiores como inferiores, en varios estudios se ha encontrado que hay una correlación entre la degeneración de neuronas motoras superiores y los niveles de NFL en suero y LCR. Esto sugiere que los neurofilamentos están muy concentrados en neuronas corticales motoras y/o en los axones de gran calibre del tracto corticoespinal. También parecen ser mayores los niveles de NFHp en pacientes con inicio bulbar de la enfermedad [4,6].

Los neurofilamentos tienen también una utilidad pronóstica. Mayores niveles de NFHp y NFL en LCR y sangre al inicio de la evaluación predicen una progresión más rápida de la enfermedad y una menor supervivencia [4,6].

Un estudio reciente encontró que había niveles elevados de NFHp y NFL en el LCR y sangre de portadores sintomáticos de mutaciones de ELA (*C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP*), pero no en portadores asintomáticos de estas mutaciones: las concentraciones de estos neurofilamentos eran normales hasta el inicio de los síntomas, momento en el que incrementaban rápidamente. Esto sugiere que los neurofilamentos pueden ser útiles en la identificación del momento en el que los portadores asintomáticos pasan a ser sintomáticos.

Otro estudio mostró que la concentración de NFL en LCR y suero puede ser un biomarcador pronóstico de personas pre-sintomáticas, ya que experimenta un aumento aproximadamente 12 meses antes del inicio clínicamente evidente de la enfermedad.

Se ha visto, por lo tanto, que un aumento de las concentraciones de neurofilamentos podría dar una idea de la etapa de la enfermedad en la que se encuentra el paciente, pero otros estudios centrados en las concentraciones de neurofilamentos a lo largo de la enfermedad son conflictivos. En general, la proteína NFHp en LCR se ha mostrado estable a lo largo del tiempo, pero su medida en sangre da lugar a diferentes resultados, habiendo en algunos estudios un incremento en etapas tempranas de la enfermedad. En cuanto a la proteína NFL, en un estudio se encontró que sus niveles en sangre eran relativamente estables en el tiempo, mientras que en LCR se observó un pequeño incremento a lo largo del tiempo en pacientes con progresiones lentas y rápidas, pero no en intermedias [4,6].

Como se ha podido observar, la cantidad de estudios realizados sobre los neurofilamentos evidencia el potencial que tienen como biomarcadores. Hemos visto su capacidad de indicar ELA, de distinguir entre diferentes enfermedades neurodegenerativas y de diferenciar distintos subtipos o formas de ELA. También hemos observado su valor pronóstico y de detección de pacientes pre-sintomáticos. Son los biomarcadores en fluidos más investigados y existen estudios multicéntricos que muestran que los niveles de neurofilamentos son comparables en la mayoría de publicaciones, sugiriendo que serán próximamente incorporados de manera consistente en la práctica clínica [4]. Aun así, la información que apoya su uso como biomarcadores es aún incompleta, y serán necesarios más estudios para determinar, por ejemplo, propiedades desconocidas de estas proteínas como su vida media en el LCR y la sangre.

B) Proteínas DPR y SOD1

Las proteínas DPR son biomarcadores específicos de la mutación que ocurre en el gen *C9ORF72*. Hemos visto que esta mutación es una base patológica común de la ELA y la DFT, por lo que podrían ser útiles como biomarcadores en ambas patologías cuando presentan esta mutación.

El ARN que se transcribe de la expansión de la repetición del hexanucleótido que ocurre en *C9ORF72* da lugar a una traducción, llamada traducción asociada a repeticiones no-ATG, que resulta en la producción de cinco posibles polipéptidos distintos: las proteínas DPR. Estas proteínas inducen neurotoxicidad y forman inclusiones neuronales en el cerebro y en la médula espinal de pacientes de ELA y DFT. Además, son detectables en el LCR [1,6].

La relación entre su expresión y la actividad clínico-patológica de la enfermedad no está clara. En algunas ocasiones se ha encontrado una relación inversa entre la cantidad de proteínas DPR y la gravedad de la neurodegeneración. La causa por la que aparece este inesperado resultado aún no ha sido descubierta [1].

Por el momento, no se ha encontrado asociación con la edad del inicio de los síntomas, ni con la supervivencia, ni con la neurodegeneración. Aunque podrían aportar más especificidad que otros biomarcadores al estar relacionadas solo con un tipo de mutación, no han mostrado tener utilidad diagnóstica ni pronóstica. Será necesaria una investigación más extensa para determinar si las proteínas DPR pueden tener alguna aplicación como biomarcadores.

La proteína SOD1 proviene de la mutación en *SOD1* y, al igual que las anteriores, es específica de un solo tipo de mutación causante de ELA y forma inclusiones en los pacientes con esta mutación. Hasta ahora, tampoco se ha encontrado utilidad diagnóstica ni pronóstica.

D) Proteína TDP-43

La proteína TDP-43 es una proteína codificada por el gen *TARDBP* que participa en la producción de micro-ARN (ARN regulatorio) y normalmente se encuentra en el núcleo. Debido a mutaciones o condiciones de estrés, puede translocarse al citoplasma, donde es susceptible de hiperfosforilación, ubiquitinación y agregación [4]. Se han encontrado inclusiones de estas proteínas en el cerebro y la médula espinal de prácticamente todos los pacientes de ELA esporádica. También se encuentran en la mayoría de los pacientes de ELA familiar, menos en los casos de mutaciones en *SOD1* o *FUS*. Además, se encuentran en la mitad de los casos DFT (en la forma FTLD-TDP) y en otras enfermedades neurodegenerativas [13]. Basándonos en esto, la presencia de agregados de TDP-43 o formas anómalas de TDP-43 son un potencial biomarcador en la ELA y la DFT e incluso podrían ser un biomarcador universal en la ELA [4].

En ambas enfermedades se han encontrado, incluso en fases tempranas, niveles elevados de TDP-43 en el LCR y el plasma. En la ELA los niveles son mayores y parecen disminuir en el LCR a medida que progresa la enfermedad, lo que puede ser consecuencia de la disminución de neuronas motoras supervivientes que liberan la proteína [6]. Aunque en un estudio no se encontraron diferencias entre los niveles de TDP-43 en la ELA *C9ORF72* y los niveles en otros subtipos de la enfermedad, un nuevo estudio ha demostrado que hay variantes de TDP-43 específicas para algunos subtipos. Por ejemplo, en los portadores de la mutación en *C9ORF72* se ha encontrado una forma de TDP-43 diferente a la encontrada en ELA esporádica. Se han creado anticuerpos capaces de dirigirse a distintas variantes de TDP-43, que pueden ser útiles no solo para el diagnóstico de la enfermedad, sino para la estratificación de pacientes [4].

En cuanto a su poder de diagnóstico diferencial respecto a otras enfermedades, se ha demostrado que la determinación de TDP-43 en LCR podría diferenciar enfermedades como Parkinson, esclerosis múltiple y el síndrome de Guillain-Barré, de la ELA [4].

Dada la alta prevalencia de la patología TDP-43 y el avance en el conocimiento de su papel en el control de la función neuronal, el estudio de TDP-43 como biomarcador puede tener amplias aplicaciones. Se ha demostrado que puede tener poder diagnóstico en casi cualquier tipo de ELA, distinguir entre los distintos subtipos y ser útil en el diagnóstico diferencial. Además, existe un posible potencial pronóstico. Sin embargo, su utilidad en fases pre-sintomáticas o tempranas no está tan clara y aún hay que resolver el hecho de que los resultados relacionados con los niveles de TDP-43 no son iguales en todos los estudios. Esto puede deberse a limitaciones técnicas en la detección de esta proteína, ya que es auto-agregante, lo que puede impedir la unión de anticuerpos, y además se presenta en dos isoformas diferentes con distinta especificidad de unión [6].

E) MicroARNs

Los microARNs son un tipo de ARN no codificante implicados en la regulación de la traducción mediante el silenciamiento de ARN mensajero [6]. Son abundantes en el cerebro, donde se expresa un perfil específico de microARNs que participan en la fisiología del SNC. Se ha observado una alteración en la expresión de los microARNs en distintas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la ELA, la DFT, el Parkinson y el Alzheimer [14]. En la ELA, se han encontrado niveles reducidos de los microARNs en general y aunque su papel en la patología no está establecido, su disminución y su alteración se presentan de forma sistemática en la enfermedad, lo que indica un potencial como biomarcador [1]. Cabe destacar que varios

genes implicados en la ELA están relacionados con el procesamiento del ARN (*TARDBP*, *FUS*, *ANG*, *SETX*) [2,15]

Los microARNs poseen características intrínsecas que los convierten en buenos biomarcadores de manera general: aunque son ubicuos, algunos tipos presentan especificidad celular, por lo que podría haber especificidad en cuanto a la enfermedad. Además, son muy estables, por lo que pueden ser fácilmente analizados y medidos. Recientemente se ha demostrado que su detección en fluidos biológicos puede reflejar cambios en las células de origen, como las neuronas [2].

Tanto los niveles globalmente reducidos de microARN como su expresión alterada, que pueden indicar ELA, son detectables en el LCR y la sangre de los pacientes.

Debido a su especificidad, los microARNs podrían ser capaces de distinguir distintas enfermedades. Se han realizado estudios que analizan los microARNs en la ELA y en otras enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple) para determinar si los microARNs identificados son realmente específicos de la ELA o están asociados a la neurodegeneración. Se ha encontrado una especie de microARN, miR-183, posiblemente específico para la ELA esporádica y otras, miR-451 y miR-3935, que podrían ser más generales para enfermedades neurodegenerativas. También hay resultados que muestran la capacidad de los microARNs de distinguir la patología TDP-43 y la ELA esporádica de la familiar [6]. Estos resultados confirman su potencial como biomarcadores diagnósticos. [2]

Otra característica destacable de los microARNs como biomarcadores en la ELA es su posibilidad de identificar la enfermedad en fases muy tempranas, incluso antes de la manifestación clínica. Se ha encontrado una disminución en un perfil específico de microARNs en portadores pre-sintomáticos de mutaciones de ELA, que además es independiente del gen afectado. Si estos descubrimientos se confirman, los microARNs podrían ser fundamentales para el desarrollo de la detección temprana de la ELA y de estrategias terapéuticas preventivas [2].

Con respecto al pronóstico, se han realizado estudios centrados en la correlación entre la expresión de microARNs y las características clínicas de la ELA, midiendo esta molécula en el mismo paciente en distintos momentos de su evolución. Aunque algunos no fueron concluyentes, en otros se encontró asociación entre los niveles de microARNs y el lugar de inicio de la enfermedad, la escala ALSFRS-R y la progresión de la enfermedad [2].

Así, hemos visto que los microARNs, sobre todo si se analiza un perfil específico y no solo un tipo, se presentan como buenos biomarcadores con potencial de diagnóstico diferencial, de

distinguir distintas formas de la enfermedad, de diagnóstico temprano y además, posiblemente presentan utilidad pronóstica. Sin embargo, aunque los resultados son prometedores, no han sido uniformes en todos los estudios. Existe cierta heterogeneidad entre los distintos microARNs identificados y en los niveles encontrados. Una posible razón es la dificultad en la detección por su pequeño tamaño, la similitud entre los distintos tipos o los bajos niveles encontrados.

F) Biomarcadores inflamatorios

La neuroinflamación es una característica común de varias enfermedades neurodegenerativas. El mecanismo por el cual está relacionada con la ELA no está claro. Se sabe que la neuroinflamación está asociada con la muerte neuronal y que las células inmunes están implicadas en la supervivencia de las neuronas motoras, teniendo efectos nocivos o de protección según la fase de la enfermedad [16]. Además, se cree que interviene en la expansión de la enfermedad a regiones distintas a las del inicio. Lo destacable es que, aunque no se conozca exactamente cuál es el papel que tiene la neuroinflamación en la ELA, es detectable incluso en la fase asintomática de la enfermedad. De este modo, distintas características relacionadas con ella pueden servir como biomarcadores [1].

Esta inflamación está caracterizada por la infiltración de linfocitos y macrófagos en el SNC, la activación de la microglía y de los astrocitos y la participación del complemento [16]. Por lo tanto, las citoquinas (mediadores de la inflamación secretados por linfocitos y macrófagos), los linfocitos y los marcadores de activación microglial y astrocítica son biomarcadores potenciales en esta enfermedad.

• Citoquinas

Se cree que la inflamación mediada por citoquinas tiene un papel clave para el inicio o desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. En el LCR de pacientes de ELA se han encontrado alteraciones en distintas citoquinas y también en proteínas del complemento, que incluyen tanto niveles mayores como menores que en los controles sanos o con otras enfermedades neurológicas [6]. En el plasma se han encontrado niveles altos de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-6 e IL-8 y también de citoquinas anti-inflamatorias, como TFG- β . Mayores niveles de IL-6 y menores de IL-2 se han asociado con una mayor probabilidad de diagnóstico de ELA [6,17]. Según un metanálisis centrado en varias enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer y ELA), existe un perfil de respuesta inflamatoria en el SNC único para cada enfermedad. Esto supone que pueden tener utilidad en la diferenciación de estas enfermedades [18]. Los niveles de IL-6 y TNF- α no sólo fueron mayores

que en los controles al inicio de la evaluación, sino que también experimentaron un aumento a medida que la enfermedad progresaba. Sin embargo, hay estudios longitudinales que no han encontrado diferencias significativas en los niveles de marcadores inflamatorios entre dos momentos del tiempo y [17].

- **Linfocitos**

Algunos tipos de células inflamatorias podrían ser útiles como marcadores de la neuroinflamación. Por ejemplo, los linfocitos T reguladores, que pueden suprimir la neuroinflamación, han mostrado ser menos efectivos en la supresión de la proliferación de linfocitos T en los pacientes de ELA. Esta disfunción se ha correlacionado con el ritmo de progresión de la enfermedad[6].

- **Marcadores de activación microglial**

La microglía está muy relacionada con la neuroinflamación de la ELA y su activación parece contribuir al progreso de la enfermedad. En un estudio de la función de la proteína codificada por *C9ORF72* cuando no hay mutación, se encontró que su inactivación daba lugar a microglía anormal y a neuroinflamación. Se demostró así que la inflamación mediada por la microglía podría contribuir a la enfermedad y además, que la pérdida de la proteína *C9orf72*, que ocurre en ELA y DFT *C9ORF72*, podría contribuir a la patología [1]. Por eso, los marcadores de activación microglial podrían ser útiles como biomarcadores y han sido investigados tanto en la ELA como en la DFT. La chitotriosidasa (*CHIT1*) es uno de los marcadores que ha sido recientemente estudiado. Sus niveles en LCR parecen ser más altos en pacientes de ELA que en controles sanos y con otras enfermedades neurológicas, por lo que pueden ser útiles para el diagnóstico diferencial. Además, tienen poder de predicción del ritmo de progresión de la enfermedad, aunque no están relacionados con la supervivencia. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de *CHIT1* de pacientes de DFT y los controles. Hay otros marcadores que también podrían reflejar la activación de la microglía en el espectro ELA-DFT, incluyendo la proteína fibrilar ácida (*GFAP*) y la proteína *S100-B*. Se cree que una combinación de marcadores de activación microglial, más que un solo marcador, podría ser útil en el estudio de la patología ELA-DFT [6,13,19].

- **Marcadores de activación astrocítica**

Hay otro tipo de célula glial, los astrocitos, que también parecen estar implicados en la neuroinflamación. Se ha estudiado un marcador de activación astrocítica, *YKL-40*, tanto en la

ELA como en la DFT, encontrando aumentados los niveles de YKL-40 en las dos enfermedades. Su valor diagnóstico de forma individual es debatible, pero su uso junto a otros biomarcadores podría ser de gran utilidad. En la ELA está correlacionada con el ritmo de progresión y con la supervivencia, aunque aún tiene que ser más estudiado [10].

Como se ha podido observar, la cantidad de moléculas y células que intervienen en la neuroinflamación y que podrían ser biomarcadores de la enfermedad hacen que sea una línea de investigación muy interesante. Se ha demostrado que pueden indicar neuroinflamación y a la vez ser más específicos teniendo valor de diagnóstico diferencial. Además, su posible valor pronóstico y detección en zonas periféricas o en etapas pre-sintomáticas de la enfermedad los hacen aún más llamativos. No obstante, aún son necesarios más estudios para su validación, ya que muchos resultados no son completos o uniformes en los estudios ya realizados. Será importante adquirir una mejor comprensión de las respuestas inflamatorias que se producen en estas enfermedades.

G) Biomarcadores metabólicos

El metaboloma, el conjunto de metabolitos del organismo, es uno de los resultados finales de la interacción de los genes con el entorno y se relaciona directamente con el fenotipo. Su estudio puede ser útil en la caracterización o en la discriminación de características fisiopatológicas de distintas enfermedades neurodegenerativas. Algunos metabolitos han sido propuestos como biomarcadores diagnósticos o pronósticos de estas enfermedades. Veremos algunos ejemplos estudiados en la ELA [20].

- **Ácido úrico**

Como se mencionó inicialmente, el estrés oxidativo está probablemente implicado en la patogénesis de la ELA. Por ello, el ácido úrico, un antioxidante fisiológico, ha sido analizado en distintos estudios. Se han encontrado niveles más bajos de ácido úrico en el suero de pacientes de ELA comparado con controles sanos, lo que indica potencial diagnóstico, aunque no parece tener valor de diagnóstico diferencial. Además, se han correlacionado mayores niveles iniciales de ácido úrico con una progresión más lenta de la enfermedad y con una mayor supervivencia [6,21,22].

- **Albúmina, creatinina y lípidos**

A través de observaciones clínicas se ha encontrado que un IMC bajo y la malnutrición tienen un valor pronóstico negativo. Se ha comprobado que los niveles de albúmina, creatinina y lípidos en suero, correlacionados respectivamente con el estado nutricional, la masa muscular y la masa grasa, podrían ser predictores de la supervivencia: niveles altos se asocian con una mayor supervivencia [6,22]. Distintos estudios centrados en los niveles de lípidos en la ELA sugieren que la hipolipidemia está asociada con la fisiopatología de la enfermedad, ya que se han encontrado niveles menores de colesterol total, triglicéridos, LDL y LDL/HDL en el suero de pacientes de ELA, comparándolos con controles sanos. Además, en estudios realizados con ratones con mutación en *SOD1* se ha establecido que la hipolipidemia es característica en la fase asintomática de la enfermedad [4,23].

Los recientes avances producidos en la metabolómica pueden crear una nueva dirección en el desarrollo de biomarcadores de la ELA. La utilización de un conjunto de biomarcadores metabólicos, incluidos la creatinina y el ácido úrico, podría diferenciar la ELA de enfermedades neurológicas similares con especificidad y sensibilidad, como se ha demostrado ya en un estudio [24]. Uno de los objetivos ahora es la creación de algoritmos diagnósticos y pronósticos basados en estos metabolitos [6].

3. DIFICULTADES ENCONTRADAS EN LOS ESTUDIOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS

A lo largo de los diferentes estudios realizados se han encontrado dificultades que suponen limitaciones significativas para el desarrollo de los biomarcadores. Primero, dado que muchos casos de ELA se detectan tarde y además es una enfermedad poco prevalente y de rápida letalidad, se encuentran muy pocos pacientes para su estudio. Asimismo, al ser tan heterogénea, encontrándose sintomatología muy variada y diferentes subtipos genéticos, el estudio de un tipo específico de ELA está especialmente dificultado. Esto es problemático, ya que para la validación de los biomarcadores es fundamental la realización de estudios multicéntricos, con grandes grupos de pacientes. Se requerirá en el futuro una gran coordinación entre los distintos grupos de investigación. Además, los pocos casos de ELA no son fácilmente distinguibles de los de otras enfermedades neurodegenerativas, sobre todo en las fases tempranas. En realidad, la falta de conocimiento de muchas enfermedades neurodegenerativas hace que en algunos casos los límites entre una y otra no estén claros. Un ejemplo evidente de esto es lo que ocurre con la ELA y la DFT, en las que se observan tantas similitudes: genotípicas, fenotípicas y en

los biomarcadores encontrados. Es posible empezar a visualizar estas dos enfermedades como un solo continuo patológico y a desarrollar su diagnóstico y tratamiento de forma conjunta. Sin embargo, también hay que centrarse en las diferencias encontradas, ya que pueden dar lugar a biomarcadores específicos o exclusivos dentro de este conjunto de patologías. Ocurre algo parecido con las enfermedades de la neurona motora, que podrían formar parte de una sola patología. Aún no está claro en qué enfermedades habría que enfocar el desarrollo del diagnóstico diferencial con la ELA. Es posible que se produzcan nuevos descubrimientos y avances si se realizan estudios rompiendo o alterando la diferenciación y clasificación que se ha considerado hasta ahora.

No solo se obtienen pocas muestras porque existen pocos pacientes, sino que la obtención también está dificultada porque en muchos casos es invasiva y no se puede realizar repetidamente. Por esta razón es importante el desarrollo de biomarcadores en muestras de obtención poco invasiva, como la sangre. Además, la facilidad de su obtención podría incluso llegar a permitir la realización de un cribado de la enfermedad a la población, permitiendo la detección de más pacientes y posiblemente la detección en fases tempranas.

Precisamente, una característica que se busca en los biomarcadores y para los que muchos han demostrado tener potencial es la capacidad de indicar la patología en fases tempranas o asintomáticas de la misma. Sin embargo, la validación de esta capacidad es complicada, ya que mediante el método diagnóstico actual no se detectan pacientes en tales fases, en quienes se estudiarían estos biomarcadores. Se crea una especie de círculo vicioso al impedir el método diagnóstico actual que se encuentren pacientes en los que estudiar un mejor método diagnóstico. El estudio de los pocos casos de ELA familiar, en los que se podría llegar a predecir la enfermedad mediante biomarcadores genéticos, puede suponer un avance en este sentido.

Lo que se busca, en definitiva, es mejorar el procedimiento diagnóstico fundamentalmente clínico que se ha usado hasta ahora. Los biomarcadores en fluidos que se han estudiado, a pesar de presentar un enorme potencial, aún no han podido llevar a cabo esta mejora al no haber podido ser validados.

Lo ideal sería comenzar con la validación de un biomarcador general, que se encuentre en la mayoría de los casos de ELA (en la familiar y en la esporádica), y que pueda detectarse en sangre. Este supuesto biomarcador podría estudiarse entonces en pacientes pre-sintomáticos de ELA familiar. Si se encontrara también en estos pacientes, es probable que puedan predecir la enfermedad. Así, podría comenzar la detección en grandes grupos de la población, por ejemplo, en la población de riesgo. De cualquier forma, un buen esquema seguir sería encontrar un biomarcador general y accesible y a partir de ahí, estudiar las posibilidades de un diagnóstico más temprano o más específico.

Teniendo esto en cuenta, los neurofilamentos podrían ser los más prometedores por el momento. Su estudio se encuentra muy avanzado, los resultados en los distintos grupos de investigación son comparables y han podido estudiarse en grandes grupos de pacientes. Han demostrado una muy buena asociación con la neurodegeneración, por lo que tienen el aspecto de la generalidad y además, son detectables en plasma y en etapas pre-sintomáticas. La proteína TDP-43, aunque se puede considerar una especie de biomarcador universal en la ELA, parece ser menos útil en fases tempranas. Por otro lado, los microARNs, aunque también han sido menos estudiados, tienen un gran potencial de contribuir a la especificidad del diagnóstico. Se obtendrían los mejores resultados si se pudieran llegar a utilizar varios biomarcadores, ya que es difícil que uno solo aporte toda la información necesaria. De momento, su utilización sería complementaria al diagnóstico clínico.

CONCLUSIONES

1. Los únicos biomarcadores validados actualmente para el diagnóstico y el pronóstico de la ELA son los clínicos y los genéticos. Son incapaces de establecer de forma eficaz y general un diagnóstico concreto y de detectar fases tempranas.
2. Los estudios de distintos biomarcadores en fluidos demuestran que estos tienen el potencial de mejorar considerablemente el método diagnóstico y pronóstico actual. Sin embargo, se han encontrado limitaciones que impiden su validación, por lo que queda por ver la contribución real que supondría su incorporación a la práctica clínica.
3. Los neurofilamentos son probablemente los que presentan mayor potencial. Han podido superar muchas de estas limitaciones, siendo comparables los resultados en los distintos estudios. Probablemente serán validados en un futuro cercano.
4. Se ha obtenido información, a partir del estudio de biomarcadores en diferentes enfermedades degenerativas, que se adelanta a nuestro conocimiento sobre ellas. Por las similitudes encontradas entre la ELA y la DFT es posible tratarlas como un solo continuo patológico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Taylor, J. P., Brown Jr, R. H., & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, 539(7628), 197.
2. Ricci, C., Marzocchi, C., & Battistini, S. (2018). MicroRNAs as Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, 7(11), 219.
3. Mazón, M., Vázquez Costa, J. F., Ten-Esteve, A., & Marti-Bonmati, L. (2018). Imaging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Neurodegenerative Diseases. The example of amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in neuroscience*, 12, 784.
4. Pampalakis, G., Mitropoulos, K., Xeromerisiou, G., Dardiotis, E., Deretzi, G., Anagnostouli, M., ... & Patrinos, G. P. (2018). New molecular diagnostic trends and biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Human mutation*.
5. Bucheli, M. E., Campos, M., Bermudes, D. B., Chuquimarca, J. P., Sambache, K., Cheverrez, K., ... & Guerrero, P. (2012). Esclerosis Lateral Amiotrófica: Criterios de El Escorial y la Electromiografía en su Temprano Diagnóstico. *Reportes de Casos Clínicos*, 21(1-3), 61.
6. Taga, A., & Maragakis, N. J. (2018). Current and emerging ALS biomarkers: utility and potential in clinical trials. *Expert review of neurotherapeutics*, 18(11), 871-886.
7. Universidad Complutense de Madrid (2009). Biomarcadores de Esclerosis Lateral Amiotrófica. Presentado en la XI Jornada Científica sobre ELA en la Universidad Complutense de Madrid.
8. Xu, Z., Poidevin, M., Li, X., Li, Y., Shu, L., Nelson, D. L., ... & Jin, P. (2013). Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(19), 7778-7783.
9. Zetterberg, H., van Swieten, J. C., Boxer, A. L., & Rohrer, J. D. (2018). Fluid biomarkers for frontotemporal dementias. *Neuropathology and applied neurobiology*.
10. Illán-Gala, I., Alcolea, D., Montal, V., Dols-Icardo, O., Muñoz, L., de Luna, N., ... & Sala, I. (2018). CSF sAPP β , YKL-40, and NfL along the ALS-FTD spectrum. *Neurology*, 91(17), e1619-e1628
11. Zucchi, E., Bedin, R., Fasano, A., Fini, N., Gessani, A., Vinceti, M., & Mandrioli, J. (2018). Cerebrospinal Fluid Neurofilaments May Discriminate Upper Motor Neuron Syndromes: A Pilot Study. *Neurodegenerative Diseases*, 18(5-6), 255-261.
12. Kay Floete, M., Genodron F, T. (2018) Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Associated With Hexanucleotide Expansion Mutations in *C9orf72*. *Frontiers in neurology*, 9, 1063.
13. Steinacker, P., Barschke, P., & Otto, M. (2018). Biomarkers for diseases with TDP-43 pathology. *Molecular and Cellular Neuroscience*.
14. Piscopo, P., Albani, D., Castellano, A. E., Forloni, G., & Confaloni, A. (2016). Frontotemporal lobar degeneration and MicroRNAs. *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 17.
15. Strong, M. J. (2010). The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Journal of the neurological sciences*, 288(1-2), 1-12.
16. Liu, J., & Wang, F. (2017). Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: cellular mechanisms and therapeutic implications. *Frontiers in immunology*, 8, 1005.
17. Prado, L. D. G. R., Rocha, N. P., de Souza, L. C., Bicalho, I. C. S., Gomez, R. S., Vidigal-Lopes, M., ... & Teixeira, A. L. (2018). Longitudinal assessment of clinical and inflammatory markers in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 394, 69-74.
18. Cheng, Y., Cheng, X., Hu, Y., Cao, Z., & Liu, Q. (2018). Cerebrospinal fluid inflammatory cytokine aberrations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in immunology*, 9, 2122.
19. Steinacker, P., Verde, F., Fang, L., Feneberg, E., Oeckl, P., Roeber, S., ... & Fließbach, K. (2018). Chitotriosidase (CHIT1) is increased in microglia and macrophages in spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis and cerebrospinal fluid levels correlate with disease severity and progression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 89(3), 239-247.
20. Kori, M., Aydın, B., Unal, S., Arga, K. Y., & Kazan, D. (2016). Metabolic biomarkers and neurodegeneration: a pathway enrichment analysis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *OmicS: a journal of integrative biology*, 20(11), 645-661.
21. Zoccolella, S., Simone, I. L., Capozzo, R., Tortelli, R., Leo, A., D'Errico, E., & Logroscino, G. (2011). An exploratory study of serum urate levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology*, 258(2), 238-243.
22. Zoccolella, S., Simone, I. L., Capozzo, R., Tortelli, R., Leo, A., D'Errico, E., & Logroscino, G. (2011). An exploratory study of serum urate levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology*, 258(2), 238-243.
23. Yang, J. W., Kim, S. M., Kim, H. J., Kim, J. E., Park, K. S., Kim, S. H., ... & Sung, J. J. (2013). Hypolipidemia in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a possible gender difference?. *Journal of Clinical Neurology*, 9(2), 125-129
24. Lawton, K. A., Brown, M. V., Alexander, D., Li, Z., Wulff, J. E., Lawson, R., ... & Cudkovicz, M. E. (2014). Plasma metabolomic biomarker panel to distinguish patients with amyotrophic lateral sclerosis from disease mimics. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 15(5-6), 362-370.