

ÍNDICES

1 ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICES	1
1 ÍNDICE DE CONTENIDOS	2
2 LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	6
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	13
1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA E.L.A.	14
1.1 CONSIDERACIONES EPIDEMIOLÓGICAS	17
1.1.1 INCIDENCIA Y PREVALENCIA	17
1.1.2 SUPERVIVENCIA	18
2 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LA ELA	19
2.1 ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA	20
2.1.1 ELA 1	20
2.1.2 ELA 2	22
2.1.3 ELA 4	22
2.1.4 OTROS LOCI EN LA ELA	22
2.1.5 ESTUDIOS DE GENES CANDIDATO EN ELA	23
3 TEORÍAS ETIOPATOGÉNICAS	23
3.1 ESTRUCTURA Y ACTIVIDADES DE LA PROTEÍNA SOD1	23
3.1.1 MUTACIONES SOD1	25
3.1.2 PROPIEDADES TÓXICAS PROPUESTAS DEL ENZIMA MUTANTE SOD1.	26
3.1.2.1 Reactividad alterada con el sustrato del enzima	26
3.1.2.2 Toxicidad de los metales (cofactores)	26
3.1.2.3 Interacciones aberrantes con otras proteínas	27
3.2 ESTRÉS OXIDATIVO	27
3.3 ALTERACIONES MITOCONDRIALES	28
3.3.1 ALTERACIONES MORFOLÓGICAS	28
3.3.2 HOMEOSTASIS DE RADICALES LIBRES	29
3.3.3 ACTIVIDAD ALTERADA DE LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL	29
3.3.4 GENOMA MITOCONDRIAL	29
3.3.5 HOMEOSTASIS DE CALCIO	30
3.3.6 ALTERACIONES EN LOS NIVELES DE SOD2	30
3.3.7 EVIDENCIAS PROVENIENTES DE MODELOS DE RATONES TRANSGÉNICOS	30
3.4 OTRAS TEORÍAS DE TRASCENDENCIA EN LA DEGENERACIÓN DE NEURONAS MOTORAS	30
OBJETIVOS	31

<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	33
<u>1 PACIENTES SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO GENÉTICO DE SOD1</u>	34
1.1 FAMILIA A	34
1.2 FAMILIA B	34
1.3 FAMILIA C	35
<u>2 ANÁLISIS MOLECULAR</u>	35
2.1 SSCP Y SECUENCIACIÓN	35
2.2 ANÁLISIS PATOGENICO DE LAS NUEVAS MUTACIONES ENCONTRADAS	37
2.2.1 MUTACIÓN N65S SOD1:	37
2.2.2 MUTACIÓN I112M SOD1:	37
<u>3 CULTIVOS DE FIBROBLASTOS (MUESTRA DE ESTUDIO)</u>	38
<u>4 ESTUDIOS BIOQUÍMICOS EN LOS CULTIVOS DE FIBROBLASTOS</u>	39
4.1 ESTUDIO DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL	39
4.2 MEDIDA DEL COENZIMA Q MEDIANTE HPLC	40
4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ATP CELULAR	41
4.4 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	41
4.4.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA	41
4.4.2 CATALASA	42
4.4.3 GLUTATION PEROXIDASA	42
<u>5 ESTUDIOS CELULARES EN LOS CULTIVOS DE FIBROBLASTOS</u>	42
5.1 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD RELATIVA DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	42
5.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUTATION	43
5.3 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	43
<u>6 DETECCIÓN DE DELECCIONES Y DEPLECIÓN EN EL ADN MITOCONDRIAL</u>	44
<u>7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	44
<u>RESULTADOS</u>	45
<u>1 SELECCIÓN DE PACIENTES</u>	46
<u>2 ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN SOD1</u>	46
2.1 SSCP	46
2.2 SECUENCIACIÓN	50
<u>3 ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD</u>	52

3.1	RFLP	52
3.2	ESTUDIOS EN LA ESCALA EVOLUTIVA	54
4	<u>REALIZACIÓN DE LA ‘MUESTRA DE ESTUDIO’</u>	55
5	<u>ESTUDIO DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL</u>	56
5.1	ACTIVIDADES DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL	56
5.2	MEDIDA DEL ESTADO DE OXIDACIÓN DEL COENZIMA Q	57
5.3	CONCENTRACIÓN DE ATP	57
6	<u>ESTUDIO DE LOS ENZIMAS DESTOXIFICANTES DE EROS</u>	58
7	<u>ESTUDIO DE LA CANTIDAD RELATIVA DE EROS, CONCENTRACIÓN DE GLUTATION Y POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL</u>	59
7.1	EROS	59
7.2	GLUTATION	61
7.3	POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	61
8	<u>ESTUDIO DEL ADN MITOCONDRIAL MEDIANTE SOUTHERN BLOT</u>	62
	<u>DISCUSIÓN</u>	65
1	<u>ESTUDIO GENÉTICO DE <i>SOD1</i> EN PACIENTES ELAE Y ELAF EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA</u>	66
1.1	RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS	66
1.2	MUTACIONES ENCONTRADAS Y PATOGENICIDAD	67
1.2.1	G37R <i>SOD1</i>	68
1.2.2	N65S <i>SOD1</i>	68
1.2.3	I112M <i>SOD1</i>	69
2	<u>ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y CELULARES EN FIBROBLASTOS DE PACIENTES ELAE Y ELAF</u>	70
2.1	EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL	70
2.2	EVALUACIÓN DEL ESTATUS DE FORMACIÓN Y DESTOXIFICACIÓN DE EROS	71
2.2.1	ASPECTOS GENERALES	71
2.2.2	RESULTADOS EN ELAF ASOCIADA CON MUTACIONES <i>SOD1</i>	72
2.3	ESTUDIO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	73
2.4	ESTUDIOS DEL ADN MITOCONDRIAL	74
3	<u>CONSIDERACIONES FINALES</u>	74
	<u>CONCLUSIONES</u>	77
	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	79

ANEXOS	89
1 ANEXO 1: ENFERMEDADES DE NM EN EL ADULTO	90
2 ANEXO 2: SECUENCIA DEL GEN HUMANO <i>SOD1</i>	91
3 ANEXO 3: CÓDIGO GENÉTICO HUMANO.	92
4 ANEXO 4: CÓDIGOS ESTÁNDAR IUB/IUPAC DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS.	93
5 ANEXO 5: PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	94
6 ANEXO 6: OTRAS PUBLICACIONES DEL DOCTORANDO	99

2 LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

página

INTRODUCCIÓN

Figura 1 16

Criterios diagnósticos de 'El Escorial' revisados para la ELA

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 2 37

Diagrama de los resultados en el estudio de RFLP desarrollado para la mutación N65S de la proteína SOD1

Figura 3 38

Diagrama de los resultados en el estudio de RFLP desarrollado para la mutación I112M de la proteína SOD1

RESULTADOS

Figura 4 47

Análisis mediante sscp del exón 2 del gen *SOD1* en 8 miembros de la familia A

Figura 5 48

Árbol de la familia A con la mutación G37R

Figura 6 49

Análisis mediante sscp del exón 3 del gen *SOD1* en 5 pacientes ELAE

Figura 7 49

Árbol de la familia B, correspondiente a los familiares del paciente ELAE en que se localizó la mutación N65S

Figura 8 49

Análisis mediante sscp del exón 4 del gen *SOD1* en 5 miembros de la familia C

Figura 9 50

Árbol de la familia C donde se localizó la mutación I112M

Figura 10 50

Fragmento de la secuencia del exón 2 obtenida en el paciente V:2 de la familia A con la mutación G37R

Figura 11 51

Cambios comparativos de las secuencias del gen *SOD1* y enzima SOD1 en el caso de la mutación G37R

Figura 12 51

Fragmento de la secuencia del exón 3 obtenida en el paciente II:1 de la familia B con la mutación N65S

Figura 13 51

Cambios comparativos de las secuencias del gen *SOD1* y enzima SOD1 en el caso de la mutación N65S

Figura 14 52

Fragmento de la secuencia del exón 4 obtenida en el paciente IV:9 con la mutación I112M

Figura 15 52

Cambios comparativos de las secuencias del gen *SOD1* y enzima SOD1 en el caso de la mutación I112M

Figura 16 53

Análisis mediante RFLP del paciente II:1 de la familia B, y sus hermanos

Figura 17 53

Estudio de RFLP de 5 miembros de la familia C con la mutación I112M

Figura 18 54

Comparación de la evolución de la SOD1 en el fragmento que rodea la Asn de posición 65 de la proteína

Figura 19 54

Comparación de la evolución de la SOD1 en el fragmento que rodea a la Ile de posición 112 en la proteína

Figura 20 56

Representación de las medias de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

Figura 21 57

Representación de las medias obtenidas para Coenzima Q oxidado y reducido

Figura 22 57

Representación de las concentraciones de ATP

Figura 23	58
Representación gráfica de las reacciones enzimáticas de los enzimas antioxidantes	
Figura 24	59
Representación de las actividades enzimáticas de los enzimas antioxidantes	
Figura 25	59
Representación de las medidas de EROs	
Figura 26	60
Representación de las medidas de EROs en medio con galactosa y con adición de H ₂ O ₂	
Figura 27	61
Representación de las medidas de Glutation	
Figura 28	61
Representación de las medidas del Potencial de membrana mitocondrial	
Figura 29	62
Representación de las medidas del Potenc. de memb. mitoc. en medio con galactosa y con adición de H ₂ O ₂	
Figura 30	63
Southern blot	
Figura 31	63
Representación de la cantidad de ADNmt / ADNn en pacientes y controles	

TABLAS

página

INTRODUCCIÓN

Tabla 1	14
Características clínicas, electrofisiológicas y neuropatológicas de la pérdida de función de neuronas motoras en la E.L.A	
Tabla 2	15
Algoritmo diagnóstico de la ELA	
Tabla 3	19
Enfermedades de neurona motora con mutaciones y loci genéticos identificados	

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 4	36
Características generales de las reacciones de PCR utilizadas en la amplificación del gen <i>SOD1</i> para su estudio en SSCP	

RESULTADOS

Tabla 5	46
Características de los pacientes incluidos en el estudio genético de <i>SOD1</i>	
Tablas 6, 7 y 8	55
Características de los pacientes incluidos en los estudios bioquímicos y celulares – Muestra de estudio	

ABREVIATURAS

A – B

AD: Autosómico dominante
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ADNmt: ADN mitocondrial
ADNn: ADN nuclear
AEDT, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
AME: Atrofia Muscular Espinal
AMEB: Atrofia Muscular Espinobulbar
ApoE: Apolipoproteína E
AOA2: Ataxia con aprasia oculomotora
AR: Autosómico recesivo
ARN: Ácido Ribonucleico
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero
BHT: Butilhidroxitolueno (4-metil-2,6-ditertbutilfenol)
BSA: Albúmina de Suero Bovino

C

CAT: Catalasa
CoQ: Coenzima Q
CS: Citrato Sintasa
Cte: Cadena de transporte electrónico

D

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (medio de cultivo utilizado para el crecimiento de fibroblastos)
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: (ver también ADN) Desoxirribonucleic Acid – Ácido Desoxirribonucleico

E – F

EAAT2: Transportador de aminoácidos excitatorios de tipo 2
EDTA, AEDT: ácido etilendiaminotetraacético
EE.UU.: Estados Unidos de Norteamérica
ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica
ELAE: ELA Esporádica
ELAF: ELA Familiar
ELP: Esclerosis Lateral Primaria
EMG: Electromiograma
ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

G

GPx-c: Glutation Peroxidasa citosólica
GPx-p: Glutation Peroxidasa plasmática o extracelular
GPX-PH: Glutation Fosfolipoperoxidasa
GRd: Glutation Reductasa
GSH: Glutation reducido
GSSG: Glutation oxidado

H – L

h.: hora
HPLC: High Performance Liquid Chromatography - Cromatografía líquida de alta resolución
KARS: ARNt-lisil sintasa
kb: kilobase/s
kDa: Kilodalton (miles de u.m.a.)
LCR: Líquido cefalorraquídeo

M

MORN: Membrane Occupation and Recognition Nexus (motivos transmembrana y de unión a proteínas de reconocimiento de señal)

M

NAIP: Neuronal Apoptosis Inhibitory Polypeptide (gen implicado en la AME)

NBT: Nitro Blue Tetrazolium

NF: Neurofilamentos

NM: Neurona Motora - motoneurona

NMDA: Acido N-metil-D-aspartico

NMH: Neuronopatía Motora Hereditaria

NMI: Neurona Motora Inferior

NMS: Neurona Motora Superior

NO: Óxido Nítrico

P

pb: par/es de bases

PBS : Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)

PCR: Polimerase Chain Reaction – Reacción en cadena de la polimerasa (ver material y métodos)

R

RFLP: Restriction Fragment Length Polimorphism – Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (ver material y métodos)

S

SMN: Survival Motor Neuron (gen implicado en la AME)

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Single Nucleotide Polimorfism - polimorfismo mononucleotídico

SOD: Superóxido Dismutasa

SOD1: Superóxido Dismutasa dependiente de Cu/Zn – Superóxido Dismutasa Citosólica

SOD2: Superóxido Dismutasa dependiente de Mn – Superóxido Dismutasa Mitocondrial

SOD3: Superóxido Dismutasa Extracelular (dependiente de Cu y Zn)

SSCP: Single Strand Conformation Polimorphism – Polimorfismos en la conformación de la cadena sencilla (ver material y métodos)

T – Z ...

W: vatio

XR: Ligado al cromosoma X, recesivo

Ψ_m : Potencial de membrana mitocondrial

INTRODUCCIÓN

1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA E.L.A.

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (E.L.A.) es la forma más común de enfermedad de neurona motora. Originalmente descrita por Charcot ^{1,2}, se define por la evidencia de hallazgos clínicos, electrofisiológicos o neuropatológicos de degeneración progresiva de las neuronas motoras (de musculatura somática) espinales o bulbares (neuronas motoras inferiores – NMI), y las neuronas motoras piramidales en el cerebro (neuronas motoras superiores – NMS) (Tabla 1).

Neurona motora superior (NMS)	Neurona motora inferior (NMI)		Características neuropatológicas típicas
Clínica	Clínica	Electrofisiología	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Debilidad moderada 2. Pérdida de destreza 3. Movimientos enlentecidos 4. Espasticidad 5. Hiperreflexia 6. Reflejos patológicos (incluye reflejos primitivos; ej.: respuesta palmomental, glabellar, hociqueo) 7. Afectación pseudobulbar 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Debilidad severa 2. Hiporreflexia (a menudo enmascarada por la presencia de características de NMS) 3. Atrofia muscular 4. Hipotonía y flaccidez muscular 5. Fasciculaciones 6. Calambres musculares 	Denervación aguda (aumento de la actividad espontánea) Reinervación (remodelación de la unidad motora, disminución del 'patrón de reclutamiento')	Pérdida de neurona motora (corteza motora, núcleo medio del cerebro, células del hasta anterior) Agregación intraneuronal de neurofilamentos fosforilados Inclusiones intraneuronales (cuerpos de Bunina, inclusiones de hialina, cuerpos tipo Lewy) Inclusiones intraneuronales inmunorreactivas de ubiquitina (madejas, agregados) Activación astrogliar intensa (tractos degenerativos, asta ventral de la médula espinal) Atrofia por denervación en la biopsia muscular

Tabla 1
 Características clínicas, electrofisiológicas y neuropatológicas de la pérdida de función de neuronas motoras en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) ³

En la evaluación de nuevos pacientes con sospecha de ELA se deben excluir otras enfermedades que puedan dar lugar a las mismas características clínicas y electrofisiológicas.

Aunque la manifestación de estos signos varía individualmente en cada paciente, la expresión de los signos y síntomas clínicos de neurona motora superior e inferior son diferentes.

La consecución de un diagnóstico preciso por lo tanto dependerá de la combinación de hallazgos específicos en la exploración neurológica (Tabla 2).

El diagnóstico de ELA se establece desde 1990 de acuerdo con los criterios de 'El Escorial' ⁴.

Excluir enfermedades conocidas que simulen la ELA
Se asegura el diagnóstico de ELA si aparecen:
1. Signos de neurona motora inferior en al menos dos regiones
2. Signos de neurona motora superior en al menos una región
3. Progresión
4. Ausencia de:
Signos sensoriales
Anomalías de esfínteres de tipo neurogénico
Enfermedad de sistema nervioso periférico progresiva, distinta de la ELA
Síndromes similares a la ELA

Tabla 2
Algoritmo diagnóstico (modificado de Ross et al, 1998 ⁵)

En 1998 los criterios diagnósticos de 'El Escorial' se modificaron por la Federación Mundial de Neurología en la Conferencia de la 'Airlie House' en Warrington, (Virginia, EE.UU.) ⁶. Las guías clínicas resultantes se establecieron con la intención de obtener una selección más homogénea de grupos de pacientes para su participación en ensayos clínicos. Estos criterios publicados han categorizado el diagnóstico de la ELA en varios niveles de certeza dependiendo de la presencia y extensión de signos de NMI y NMS juntos en la misma región topográfica anatómica tanto en la médula espinal bulbar, como cervical, torácica o lumbosacra (figura 1).

El espectro de enfermedades de NM es amplio. La ELA representa sólo un tipo de enfermedad de neurona motora que afecta tanto las NMS como las NMI. Otras enfermedades de neurona motora afectan selectivamente poblaciones aisladas de neuronas motoras y pueden producirse por mecanismos fisiopatológicos diferentes y tener por tanto distintos pronósticos (Anexo 1).

La ELA es una de las enfermedades neurológicas más agresivas. Los recientes avances en el manejo y tratamiento de pacientes con ELA ha generado el renacimiento de alternativas terapéuticas. El uso de ventilación por presión positiva no invasiva y la intervención nutricional activa pueden llevar a marcados beneficios en la morbilidad y mortalidad de la enfermedad ^{7,8}.

Otras intervenciones terapéuticas entre las que se incluyen la fisioterapia, la terapia ocupacional y la logopedia también contribuyen a la mejora en la calidad y duración de la vida. Hasta la fecha, el uso activo de tales terapias sintomáticas y auxiliares ha producido un aumento significativo en la esperanza de vida en pacientes con ELA.

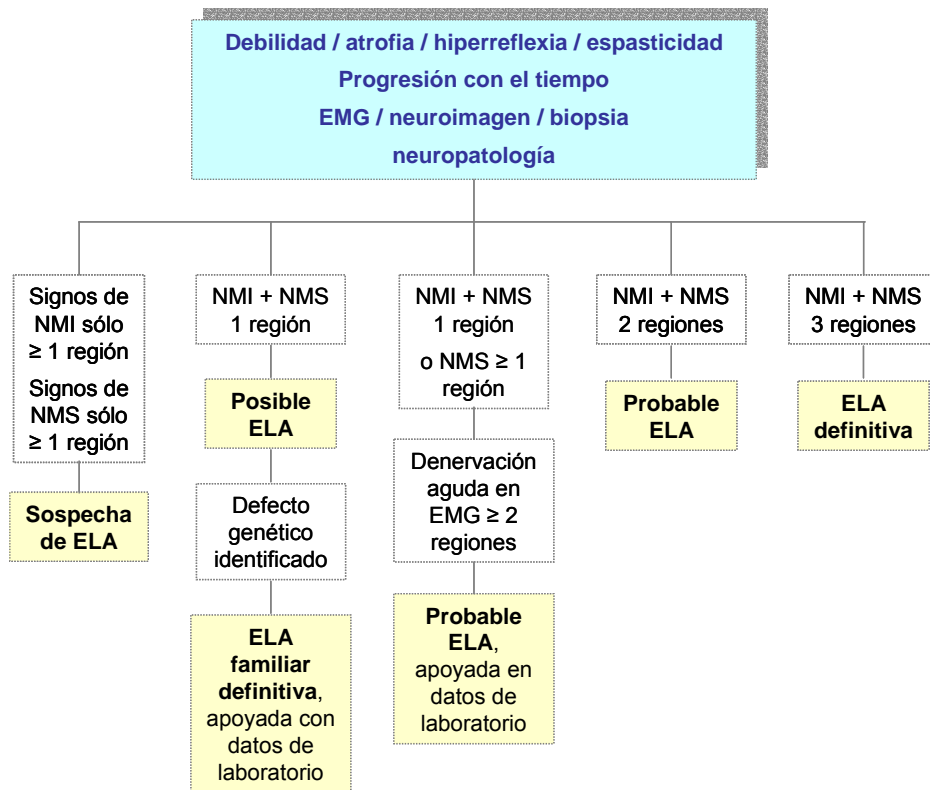


Figura 1
 Criterios diagnósticos de 'El Escorial' revisados para la ELA
 Regiones: bulbar; cérico-braquial; lumbo-sacra

La irrupción de la biología molecular y celular ha producido un avance espectacular en la elucidación del conocimiento de las enfermedades neurológicas y está ayudando a establecer vías de tratamiento novedosas. Actualmente se cree que la ELA es una enfermedad compleja y multisistémica en que concurren múltiples procesos biológicos de los que aun no conocemos su correcta interacción.

El punto de vista tradicional sobre la ELA considera que es una enfermedad restringida al sistema motor. Se reconocen tres variantes clínicas, que incluyen la clásica forma esporádica descrita por Charcot, una variante de la zona hiperendémica del oeste del Pacífico (el complejo ELA-Demencia de Guam), y las formas familiares asociadas con mutaciones en el gen que codifica para la proteína antioxidante, superóxido dismutasa dependiente de cobre/zinc (SOD1).

La pérdida selectiva de neuronas motoras es la característica neuropatológica común, tanto de las neuronas motoras superiores responsables de la inervación

supraespinal como de las neuronas motoras inferiores responsables de la inervación del músculo esquelético ⁹.

La implicación patológica fuera del sistema motor es poco frecuente, y puede incluir degeneración de las columnas posteriores. La afectación cognitiva se produce en el 30% de los pacientes, que suelen desarrollar demencia frontotemporal ^{10,11}. Los estudios neuropatológicos de dichos pacientes sugieren que los problemas cognitivos no son fenómenos aislados, sino una expresión más de la enfermedad ¹².

También se pueden observar alteraciones en microglía y en la función astrocítica en el proceso de la enfermedad. A medida que se produce un avance en la comprensión de los mecanismos moleculares de la ELA, se advierte que existe una gran expansión de daño neuronal en la enfermedad.

1.1 Consideraciones epidemiológicas

1.1.1 Incidencia y prevalencia

Los índices de incidencia y mortalidad de la ELA son dependientes de la edad, aumentando con el incremento de los años ^{13,14}.

Las tasas de incidencia y prevalencia se han situado de manera uniforme entre el 0,5 – 3 / 100.000¹⁵ y 4 – 10 / 100.000¹⁶ en diferentes ámbitos geográficos.

Existen dos aspectos de interés en la epidemiología de la ELA que condicionan un aumento del número de casos:

- i) La disponibilidad de tratamientos más agresivos (soporte ventilatorio y nutricional) ha mejorado la esperanza de vida, lo que se traduce en un aumento de la prevalencia.
- ii) Actualmente el aumento del grupo de población en riesgo más elevado (inversión de la pirámide poblacional), se traduce en un incremento de la incidencia ^{17,18}. Debido a este aumento de la población de edad más avanzada, los factores medioambientales están adquiriendo un papel relevante como causa de una cascada patológica de eventos que dan lugar a la degeneración de las neuronas motoras, si bien resulta muy difícil su identificación.

Numerosas publicaciones y revisiones han explorado la posibilidad de que un accidente, el estrés o la exposición a factores medioambientales puedan tener un papel clave en el comienzo de la degeneración motoneuronal ¹⁹. Sin embargo, estos factores son meramente especulativos dada la continua localización de áreas endémicas y factores de predisposición comunes. La excepción a todo esto es el área del Pacífico oeste, en la que es evidente que el medio ambiente juega un papel relevante en el desarrollo de la ELA ²⁰. La incidencia de la ELA en esa zona es cientos de veces superior a la observada en

Europa y América del Norte. Cuando sus habitantes se occidentalizaron (mediante la evolución de una dieta tradicional a base de vegetal y pescado a la típica norteamericana), la incidencia de la ELA disminuyó drásticamente^{20,21}. Es controvertido si esta disminución se produjo como consecuencia del reemplazamiento de la dieta tradicional a base del fruto de la 'cyca' por otros alimentos de primera necesidad alternativos; o si la corrección de la dieta previa baja en calcio y magnesio resultó en una menor absorción de especies de aluminio biodisponibles. En cualquier caso, la prevalencia disminuyó y se consideró que la clave de este proceso era la alteración en un factor medioambiental²².

Además, existen estudios que han relacionado esta enfermedad con el trabajo agrícola, personal doméstico, atletas, industria química y textil, militares en la Guerra del Golfo Pérsico, estrés tanto físico como emocional, daño eléctrico significativo, tabaco o exceso de masa corporal³.

1.1.2 Supervivencia

Las curvas de supervivencia de los pacientes de ELA se encuentran muy sesgadas, con un amplio rango desde el comienzo de los síntomas. El 50% de los pacientes fallecen antes de los 3 años, mientras que una supervivencia prolongada (> 10 años) se produce en alrededor del 20% de los pacientes.

La **localización** de los síntomas de inicio de la enfermedad se relaciona con esta supervivencia, así los pacientes con aparición de síntomas en una extremidad poseen una supervivencia media de 5 años, mientras que en los de inicio con síntomas bulbares es algo menor. Estas estimaciones no tienen en cuenta los avances recientes en el manejo de los pacientes, dado que los estudios que valoran una **intervención médica** activa se están desarrollando en la actualidad.

Una **edad de inicio** juvenil parece predecir una mayor supervivencia, tanto en los pacientes ELAE como en los que presentan ELAF²³⁻²⁵.

La proporción de afectación entre hombres por debajo de los 50 es el doble que la de las mujeres, sugiriendo un componente protector potencial de origen estrogénico²⁶. Por encima de la edad de 50 años, las curvas de supervivencia e incidencia para hombres y mujeres tienden a igualarse.

El grupo de hombres con síntomas de inicio en las manos tienen mayor probabilidad de desarrollar un curso prolongado de la enfermedad.

La variante familiar de la ELA afecta a menos del 10% de todos los pacientes, y puede encontrarse tanto con un patrón de herencia autosómico dominante como recesivo.

2 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LA ELA

Las enfermedades de neurona motora se pueden dividir en tres categorías: 1) con afectación de las neuronas motoras inferiores – atrofia muscular espinal (AME) y atrofia muscular espinobulbar (AEMB o enfermedad de Kennedy); 2) con afectación de las neuronas motoras superiores – Esclerosis Lateral Primaria (ELP) ^{27,28} y paraplejías espásticas; y 3) con afectación de los dos grupos de neuronas motoras, superiores e inferiores – Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

Las neuronopatías hereditarias (NMH), la gangliosidosis GM2, y posiblemente el síndrome ELA/P de Guam, se consideran también enfermedades de NM familiares.

La contribución de las características genéticas a la etiopatogénia de enfermedad de neurona motora varía considerablemente, de unas formas a otras siendo muy marcada en las AME, y muy escasa en ELA.

El modo de herencia también varía, con ejemplos de patrones autosómico dominante (AD), autosómico recesivos (AR), o ligados al cromosoma X. (Tabla 3)

Categoría	Modo de herencia	Localización cromosómica	Gen identificado
Esclerosis Lateral Amiotrófica			
ELA 1	AD	21q22	SOD1
ELA 2	AR	2q33-35	Elaiña
ELA 3	AD	18q21	
ELA 4	AD	9q34	Senataxina ²⁹
ELA 5	AR	15q15,1-21,1	
ELA/DFT	AD	9q21-22	
ELA 6	AD	16q12,1-12,2	
ELA 7	AD	20p tel	
ELA 8	AD	20q13 ³⁰	
Gangliosidosis GM2			
	AR	15q23-24	Hexosaminidasa A
Atrofia muscular espinal de inicio infantil y juvenil			
AME	AR	5q11,2-13,3	SMN (y NAIP)
Atrofia muscular espinal y bulbar			
AMEB	XR	Xq21-22	Receptor de andrógenos
NMH2	AD	12q24	
NMH5	AD	7p	

Tabla 3
Enfermedades de neurona motora con mutaciones y loci genéticos identificados ³¹

Los mecanismos responsables de la neuropatología y clínica de la degeneración motoneuronal asociadas a variantes genéticas se describen a continuación:

- **ELA.** Se han encontrado unas 100 mutaciones diferentes del gen *SOD1* (www.alsod.org) en grupos de pacientes con ELA con patrón de herencia autosómico dominante.
- **AME.** Existen dos copias de los genes *SMN* (survival motor neuron – supervivencia de neurona motora), *NAIP* (neuronal apoptosis inhibitory polypeptide – polipéptido inhibidor de la apoptosis neuronal), y *p44c* en cada cromosoma 5q. En la AME, las copias teloméricas de *SMN*, *SMN_t*, se encuentran eliminadas o convertidas en *SMN_c*. Los genes *NAIP* y *p44c* también pueden ser mutantes.
- **AMEB.** En la atrofia muscular espinobulbar hay una expansión en la región de repetición del codon CAG (poliglutamina) en el exón 1 del gen que codifica por el receptor de andrógenos. En un individuo normal el número de repeticiones es de 10 a 36, y en la AMEB se expande de 40 hasta 62.

2.1 Esclerosis Lateral Amiotrófica

Se han descrito familias con un patrón de herencia autosómico-dominante registrado en más de 6 generaciones.

La incidencia de los individuos con ELA que tienen otro miembro afecto en la familia es del 5 al 10%. En la mayoría de estas familias hay una clara evidencia de herencia autosómica y dominante (AD), y en raras ocasiones se encuentran familias con herencia autosómica y recesiva (AR).

Muchas familias pueden presentar únicamente dos individuos afectados en la misma generación, o incluso con relaciones más distantes; en estos casos es difícil establecer si se trata de rasgos genéticos comunes o influencia medioambiental.

El diagnóstico de AEMB (enfermedad de Kennedy) es más probable en familias con herencia recesiva ligada al cromosoma X (sólo se ven afectados los hombres y la transmisión de la enfermedad se produce a través de mujeres portadoras no afectas).

También existen datos en la literatura en los que se describen gemelos afectados, y más raramente casos de cónyuges, ambos con la enfermedad.

2.1.1 ELA 1

A finales de los ochenta y principios de la pasada década se llevaron a cabo estudios en grupos de familias AD con ELA, y se obtuvo un pico lod score con marcadores múltiples de 6,1 en el cromosoma 21q en un subgrupo de 23 familias ligadas a este

cromosoma ³². Previamente se habían encontrado picos de lod score de 5,03 a 10 centimorgans del marcador D21S58 en el cromosoma 21³².

El mapeo genético posterior dio lugar a la identificación de una región que contiene tres genes conocidos entre los que se incluye el gen que codifica la superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (SOD1) ³³. La secuenciación del gen *SOD1* en las familias ligadas a dicho locus y en individuos afectados de otras familias, evidenció la presencia de mutaciones ³⁴.

El gen *SOD1* ocupa 11 kilobases de ADN, en la región 21q22. Está presente en una copia y comprende 5 exones y 4 intrones que codifican una proteína de 153 aminoácidos.

El enzima funcional es un homodímero. La secuencia presenta un elevado grado de conservación en la escala filogenética incluyendo el hombre, el ratón, *Drosophila*, el maíz y la levadura.

Se han encontrado hasta el momento más de 100 mutaciones diferentes en el gen *SOD1*. Alrededor del 20% de las familias con ELA ³⁴⁻³⁶ muestran mutaciones en *SOD1*. La mayoría de las mutaciones son mutaciones puntuales de cambio aminoacídico; sin embargo hay también mutaciones sin sentido (nonsense) de término de la transcripción, inserciones y deleciones.

La herencia es autosómica dominante, aunque en Suecia y Finlandia se han confirmado patrones de herencia recesiva de la enfermedad ³⁷.

La penetrancia puede ser incompleta, y es dependiente de la edad. Además, se han encontrado mutaciones heterocigotas en *SOD1* en un pequeño número de pacientes con ELA 'aparentemente' esporádica. Los familiares de algunos de estos pacientes podrían sugerir penetrancia incompleta de la enfermedad, aunque permanece por determinar cuántas mutaciones son *de novo* ³⁸.

Existen individuos dentro de estas familias portadores de la mutación con actividad reducida del enzima, que no han manifestado aún la enfermedad. Es posible que estos individuos disfruten de una esperanza de vida normal y nunca lleguen a desarrollar la enfermedad, o que mueran por otras causas diferentes a la ELA.

Las características clínicas de los pacientes con mutaciones en *SOD1* son indistinguibles de las de los pacientes sin mutaciones en dicho gen. La severidad de la enfermedad, en términos de edad de inicio y duración, pueden ser variables dentro de la misma familia ³⁹. La mutación A4V suele asociarse con un pronóstico más grave. Las mutaciones G37R, G41D, y G93C predicen mayor supervivencia. G37R y L38V poseen un comienzo más temprano del fenotipo clínico ³⁶. A4V es atípica en tanto en cuanto constituye el 50% de los pacientes con mutaciones *SOD1* en EE.UU., pero es muy poco frecuente en el resto del mundo.

La ELA autosómica recesiva asociada a mutaciones homocigotas en *SOD1*, se localiza en la zona norte de Suecia y Finlandia, donde la mutación D909A se encuentra en más del 3% de la población sin sintomatología clínica. Estos pacientes tienen una presentación clínica característica, con espasmos musculares dolorosos y parestesia en las piernas, dificultad para la micción, además de las típicas afectaciones motoneuronales superior e inferior. La supervivencia media es de 13 años³⁷. En otras poblaciones se han identificado pacientes con la mutación D90A en heterocigosis que padecen la enfermedad. Todo esto sugiere que un factor genético protector ligado a la enfermedad se encuentra activo en la población sueca y finesa⁴⁰, previniendo la manifestación del fenotipo clínico en heterocigosis.

La identificación de mutaciones génicas *SOD1* en la ELA ha permitido el hallazgo no sólo de uno de los únicos factores causales conocidos de la enfermedad, sino de un subgrupo de pacientes con la misma causa etiopatogénica común⁴¹.

2.1.2 ELA 2

En la década de los ochenta se identificaron formas de ELA y Esclerosis Lateral Primaria (ELP) con herencia recesiva y de inicio juvenil entre la población tunecina, kuwaiti y saudí. Posteriores estudios de ligamiento realizados en estas familias establecieron su origen genético en el locus 2q33-35 (*ELA2*)⁴².

Recientemente se ha identificado el gen responsable en este tipo de ELA, que codifica una proteína de función desconocida y que traduciendo al castellano el nombre dado por los autores vamos a llamar Elaína^{43,44}. El enzima codificado sería un supuesto regulador de tipo GTPasa.

2.1.3 ELA 4

Recientemente se han descrito mutaciones en el gen *senataxina* que contiene un dominio helicasa de ADN/ARN, relacionadas con la forma familiar ELA4. Las familias con mutaciones en este gen son alélicas con la AOA2, (enfermedad autosómica recesiva que cursa con ataxia y aprasia oculomotora, en que falla la transcripción del gen)²⁹.

2.1.4 Otros loci en la ELA

Aproximadamente el 80% de las familias con ELA no tienen mutaciones en el gen *SOD1* o en *ELA2*. Actualmente se están realizando estudios de ligamiento en diversas familias, habiéndose determinado varios loci (Tabla 3).

2.1.5 Estudios de genes candidato en ELA

Se han estudiado un gran número de probables genes candidatos en la génesis de la ELA. No hay evidencias de mutaciones en SOD2 y catalasa, que como SOD1 juegan un papel clave en el metabolismo de radicales libres de oxígeno (EROs) ⁴⁵.

El citoesqueleto neuronal ha sido un foco de estudios genéticos en humanos y ratones transgénicos. Los agregados de neurofilamentos son una característica patológica común en neuronas de enfermos con ELA, y la interrupción del flujo axoplásmico en las grandes neuronas motoras es una atractiva hipótesis patogénica ⁴⁶. En este sentido, se han descrito mutaciones en la región C-terminal de la subunidad pesada de neurofilamentos humanos en aproximadamente el 1% de los pacientes con ELA esporádica ^{47,48}, y puede representar un factor de riesgo para la enfermedad. Se ha encontrado que la degeneración de neuronas motoras en algunos modelos animales está relacionada con alteraciones en la expresión de neurofilamentos ⁴⁹ o periferina ⁵⁰.

En cerebro, médula espinal y LCR de más del 60% de los pacientes con ELAE se encontró ARNm mutante del gen *EAAT2* (transportador de glutamato glial), sugiriéndose que era el resultado de un procesamiento anómalo del ARN ⁵¹. Sin embargo, la interpretación de estos resultados se ha complicado por el descubrimiento de variantes similares de procesamiento en controles ^{52,53}.

Se han estudiado también los genotipos de ApoE como posible factor de riesgo, con una relación entre ApoE4 e inicio bulbar, y con un comienzo más temprano de la enfermedad ⁵⁴. El número de pacientes estudiado es pequeño, y no siempre se han obtenido resultados similares en otros estudios.

En un paciente con enfermedad de neurona motora y con hallazgos histoquímicos de proliferación mitocondrial, se halló una nueva microdelección en el gen que codifica para la Citocromo C oxidasa en el ADN mitocondrial ⁵⁵.

3 TEORÍAS ETIOPATOGÉNICAS

3.1 Estructura y actividades de la proteína SOD1

Los radicales libres de oxígeno, que incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), y otras especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el óxido nítrico (NO), se generan en varias reacciones metabólicas en la célula ⁵⁶. La defensa más importante contra la producción del exceso de radicales libres es la

acción combinada de tres enzimas: superóxido dismutasa (SOD), glutathion peroxidasa, y catalasa.

SOD cataliza la conversión de superóxido a H_2O_2 . La Glutathion peroxidasa y la catalasa convierten el H_2O_2 en agua ⁵⁷. En presencia de NO, el anión superóxido puede formar peroxinitrito ($ONOO^-$), que puede reaccionar para dar lugar a radicales hidroxilo.

Se han identificado tres formas de SOD: la citosólica dependiente de cobre-zinc CuZn-SOD (SOD1), la mitocondrial dependiente de manganeso Mn-SOD (SOD2), y la extracelular dependiente también de cobre-zinc (EC-SOD o SOD3) ⁵⁶.

El anión superóxido se produce durante el metabolismo normal ⁵⁸ y es muy tóxico, pudiendo interrumpir la actividad celular mediante el ataque a membranas lipídicas, proteínas y ADN ⁵⁶.

SOD1 se expresa de manera constitutiva en todas las células eucariotas ⁵⁷. Es una proteína abundante que comprende aprox. el 1% de la proteína citosólica total ⁵⁹.

Los cinco exones del gen codifican 153 aminoácidos que forman una proteína de 16-kDa cuya funcionalidad se produce en forma de homodímero. Cada subunidad contiene un átomo de cobre y de zinc en el interior del sitio activo con forma de cueva ⁵⁸.

La cadena polipeptídica se pliega en un cilindro aplastado de ocho bandas antiparalelas de estructura β que se dividen en dos motivos de llave griega para dar lugar a la formación de un barril β . Desde ambos extremos, superior e inferior, del barril β , se extienden dos grandes bucles no helicoidales. Uno contiene la mayoría de los residuos requeridos para la direccionalidad electrostática de $O_2^{\cdot-}$, mientras el segundo contribuye a la dimerización. El sitio activo se localiza en el final del barril β , con una de las caras abiertas al exterior y en el extremo opuesto de la otra subunidad, posicionando los sitios activos en lados opuestos del enzima.

El dímero SOD1 es extremadamente estable debido a fuertes interacciones hidrofóbicas, y la dimerización dobla la actividad dismutasa.

El anión superóxido es conducido al sitio activo del enzima que contiene el ión Cu^{2+} atravesando un canal cargado positivamente ⁵⁸. El Zn^{2+} está implicado en el mantenimiento de la estabilidad del pH de la reacción de dismutación y en la rápida disociación del H_2O_2 producido, que puede inactivar lentamente a la SOD1. El acceso al sitio activo se limita por el tamaño y la carga, favoreciendo al ión $O_2^{\cdot-}$ y excluyendo grandes moléculas. SOD1 puede funcionar como peroxidasa, catalizando reacciones oxidativas de sustratos mediante el peróxido de hidrógeno ⁵⁸.

3.1.1 Mutaciones SOD1

A pesar del tiempo transcurrido (10 años) desde que se encontró la asociación entre las mutaciones en SOD1 y la ELAF, y la abundante literatura sobre mecanismos de patogénesis propuestos, la vía por la que la SOD mutada causa la muerte de las motoneuronas de manera selectiva permanece sin determinar.

Dado el papel de la SOD1 en eliminar EROs, se sugirió que las mutaciones podrían reducir su actividad, dando lugar al acúmulo de superóxidos tóxicos³⁴. Se ha documentado una disminución de la actividad SOD1 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes⁶⁰. Además, los radicales libres se han implicado en el daño neuronal en varias enfermedades neurológicas³⁴. Otra posibilidad era que una SOD con ganancia de función podría producir exceso de peróxido de hidrógeno, con posterior transformación a radical hidroxilo (más tóxico) en presencia de iones ferroso^{56,61}. Un efecto negativo dominante quiere decir que el mutante no sólo perdería función, sino que podría también perjudicar la actividad del enzima normal dando lugar a la reducción de más del 50% de actividad⁶². Sin embargo, ninguna de las hipótesis anteriores explican cómo un gen expresado en todas las células podría llevar a la selectividad de la muerte motoneuronal.

La primera aproximación para contestar a esta paradoja fue la medida de la actividad de la SOD1 mutante. Se han realizado estudios en eritrocitos (41% de actividad), apoyando la teoría negativa dominante⁶², y también en linfocitos con la mutación A4V (50%)⁶³. Las actividades fueron normales en casos esporádicos y en ELAF sin mutaciones SOD1⁶⁴. No todas las mutaciones muestran tal disminución de la actividad⁶⁵⁻⁶⁷. Además, la expresión de mutantes junto con el enzima normal muestra que las subunidades normales no se ven afectadas en su vida media o actividad⁶⁸.

En general, los enzimas están presentes y se duda que esa ligera reducción sea suficiente para producir la enfermedad. La pérdida de función se asocia a mutaciones con fenotipos recesivos, y además los portadores heterocigotos de mutaciones recesivas (donde se podría detectar la reducción del 50% en la actividad del enzima) no se encuentran clínicamente afectados.

La segunda aproximación como modelo de ELA, fue el desarrollo de ratones transgénicos que expresan las formas normales y mutantes de la SOD1 humana. Los ratones con la mutación G93A SOD1 muestran enfermedad de NM⁶⁹ y un ratón con la mutación SOD1 G86R (G85R humana) desarrolló degeneración de NM⁷⁰. Ratones transgénicos que expresan SOD1 G37R humano presentan una grave enfermedad de NM, mientras que los que expresan el gen SOD1 humano normal no sufren la enfermedad⁷¹.

Los ratones con déficit completo del enzima, provocado por delección de la secuencia completa codificante del gen SOD1 de ratón⁷², se desarrollan normalmente y

no muestran signos de enfermedad de neurona motora, aunque muestran elevada vulnerabilidad a la pérdida motoneuronal tras daño axonal, sugiriendo que SOD1 puede tener un papel más relevante en situaciones de daño que en desarrollo y funcionalidad ⁷³.

La muerte de NM se produce por toxicidad tal como se muestra en ratones transgénicos con SOD1 mutante y ausencia o elevación de la SOD1 normal ⁷⁴. El fenotipo mutante de levaduras deficientes en SOD1 se rescataba con el gen *SOD1* mutante asociado a ELAF de la misma forma que con el gen normal, confirmando la actividad suficiente del enzima mutante ⁷⁵. En neuronas, la sobre expresión de SOD1 normal inhibe la apoptosis, mientras que los mutantes ELAF la promueven, apoyando el efecto de ganancia de función tóxica ⁷⁵.

Además, no se habían detectado mutaciones nulas en SOD1 en pacientes con ELAF como cabría esperar si la pérdida de actividad fuera la causa de la enfermedad ⁷⁶.

Todas estas observaciones y evidencias experimentales dieron apoyo a la teoría de que la ELAF se causa no por la reducción de la actividad SOD1, sino más bien por la adquisición de una propiedad tóxica en el enzima mutante.

3.1.2 Propiedades tóxicas propuestas del enzima mutante SOD1.

Al menos se han investigado tres propiedades del mutante SOD1:

3.1.2.1 Reactividad alterada con el sustrato del enzima

Una de las primeras alteraciones descritas fue que las mutaciones asociadas a ELAF producen una actividad dismutasa normal pero actividad peroxidasa aumentada ^{77,78}. El canal activo del mutante ELAF es ligeramente más grande que el del enzima normal (cristalografía), apoyando que el H₂O₂ tiene acceso al enzima mutante ⁷⁸.

Además, se ha visto un aumento en los niveles de nitrotirosina en casos ELAF y ELAE, así como en los modelos animales ⁷⁹⁻⁸¹. La formación de nitrotirosina a partir de peroxinitrito se debería a la mayor afinidad del NO por O₂⁻ en el enzima mutante ⁸².

3.1.2.2 Toxicidad de los metales (cofactores)

También se ha demostrado que el mutante SOD tiene una estabilidad reducida ⁶⁷ dando lugar a menor retención de cobre y zinc, que poseen carácter neurotóxico ⁷⁶. Las mutaciones H46R y H48Q de SOD1 afectan a los ligandos de unión a cobre, por lo que no pueden fijar dicho metal ^{58,83}. Además existen mutaciones a lo largo de toda la estructura del enzima que parecen afectar a la afinidad del sitio de unión al zinc ^{84,85}. Sin embargo, las concentraciones totales de cobre y zinc libre en los pacientes con ELAF y ELAE no se correlacionaron con la severidad, la edad de inicio o la actividad SOD1 ⁸⁶.

3.1.2.3 Interacciones aberrantes con otras proteínas

La proteína mutante presenta cierto grado de inestabilidad que favorece la formación de agregados tóxicos ⁷⁶. Esto es relevante si se tiene en cuenta que la SOD1 representa aproximadamente el 1% de la proteína citosólica. Las alteraciones en el plegamiento, la solubilidad, o la degradación de una proteína tan abundante podría resultar en la producción de agregados, lo que es compatible con el hallazgo de cuerpos de inclusión inmunorreactivos para SOD1 en NM que expresan el mutante SOD1 pero no en las que expresan el enzima normal ^{59,74,87}.

La interacción de SOD1 mutante con otras proteínas (mediante el sistema de atrapamiento en levaduras modificadas) ⁸⁸, se ha observado que se produce con dos proteínas: la ARNt-lisil sintasa (KARS); y la proteína delta asociada a translocón.

3.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como las consecuencias citotóxicas de los radicales de oxígeno, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se generan en la fosforilación oxidativa ⁸⁹.

El cerebro produce la mayor parte de la energía que necesita a partir del metabolismo oxidativo de la cadena respiratoria mitocondrial. El ADN mitocondrial tiene un rango de mutación diez veces más grande que el ADN nuclear y además no posee mecanismos de reparación eficientes; las mitocondrias de cerebro son por tanto particularmente susceptibles al daño oxidativo dado la extensa generación de oxidantes celulares en este órgano. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) a su vez se han visto implicadas en el envejecimiento y la sobreexpresión de SOD1, y quimeras SOD1/catalasa aumentan la esperanza de vida en *Drosophila* ⁹⁰ y *C. elegans* ⁹¹. Además, se conoce la acumulación en el daño oxidativo al ADN mt en SNC relacionada con la edad ⁹².

El anión superóxido reacciona espontáneamente con el óxido nítrico para formar peroxinitrito. De este modo aparecen intermedios de nitronio altamente reactivos y capaces de nitrar grupos de tirosina en proteínas y formar el compuesto estable 3-nitrotirosina ^{82,93}. Se han encontrado niveles de nitrotirosina elevados en casos ELAF y ELAE, así como en animales ^{79-81,94,95}. Los neurofilamentos (NF) son unos candidatos atractivos para la nitración; la cadena ligera tiene 20 tirosinas, 9 de las cuales se encuentran en el dominio inicial, básico para el ensamblaje ⁹⁶. La colocalización de agregados de NF con SOD1 y NOS cerebral en neuronas motoras de ELA (ELAF, con y sin mutaciones SOD1 y ELAE) apoya la teoría de que la fosforilación y el ensamblaje de NF

está alterado por residuos nitrados de tirosina. Sin embargo no se han detectado niveles medibles de nitrotirosina en las subunidades de NF ⁹⁶.

No se han encontrado evidencias de aumento del estrés oxidativo en fibroblastos de pacientes ELAF sin mutaciones SOD1 ⁹⁷.

Alternativamente, la capacidad de los mutantes de utilizar H₂O₂ como sustrato, probablemente debido al aumento de la capacidad del sitio del Cu²⁺, puede conducir a la generación de radicales hidroxilo y daño celular. Se ha visto que varias mutaciones SOD1 tienen aumentada la actividad peroxidasa dependiente de cobre ^{77,78,98,99}, aunque alguna publicación ha discutido este hallazgo ¹⁰⁰.

Existen varios mecanismos de defensa dedicados a la reducción de los niveles de oxidantes: SOD, catalasa, ciclo del glutatión, ácido ascórbico (vitamina C), y α-tocoferol (vitamina E). Un desequilibrio entre mecanismos oxidantes y antioxidantes puede favorecer el daño neuronal, como ocurre en la deficiencia de vitamina E ⁸⁹. El beneficio de antioxidantes en la ELA se demostró mediante el tratamiento de ratones transgénicos mutantes SOD1 con vitamina E ¹⁰¹ y en cultivos celulares ¹⁰². Sin embargo, los ensayos clínicos de antioxidantes no han resultado de tanto éxito como el esperado ^{103,104}.

3.3 Alteraciones mitocondriales

Las propiedades mitocondriales más relevantes ¹⁰⁵ en las enfermedades neurodegenerativas serían: la fosforilación oxidativa; la generación de radicales libres; la biogénesis mitocondrial; la homeostasis intracelular de calcio; la vulnerabilidad a cambios relacionados con la edad y la mitocondria en cuanto a factor iniciador de la apoptosis.

Teniendo en cuenta la importancia de la mitocondria en todos estos procesos metabólicos se han encontrado diversas alteraciones que confirman su implicación en la degeneración de neuronas motoras en la ELA:

3.3.1 Alteraciones morfológicas

La primeras evidencias morfológicas de alteración mitocondrial descritas fueron ¹⁰⁶: mitocondrias en forma de acúmulos en la región subsarcolémica, 'mitocondrias centinela' en línea (a lo largo de la línea Z) grandes y densas en los sarcómeros, reducción del número de mitocondrias en áreas en degeneración del músculo y en nervios intramusculares de pacientes de ELA ¹⁰⁷.

También se han observado anomalías en células hepáticas, descritas como 'mitocondrias gigantes', e inclusiones paracrystalinas en algunos casos ¹⁰⁸. También se han observado engrosamientos axonales en el tracto corticoespinal que contienen organelas intracelulares, incluidas mitocondrias y NF ¹⁰⁹, y más recientemente, conglomerados

densos de agregados mitocondriales en la sinapsis de neuronas motoras en degeneración en médula espinal ventral de pacientes con ELA ¹¹⁰.

3.3.2 Homeostasis de radicales libres

Se han observado aumentos en los niveles de carbonilo proteico en médula espinal ¹¹¹ y córtex frontal ¹¹² de pacientes con ELA así como niveles de 3-nitrotirosina en médula espinal torácica y lumbar ⁸⁰.

Un marcador lipídico de peroxidación, el 4-hidroxinonal, ha demostrado ser un inhibidor de la función respiratoria mitocondrial ^{113,114} y se ha visto aumentado en LCR ¹¹⁵.

3.3.3 Actividad alterada de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

En 1993 se describió un aumento de la actividad del complejo I en corteza frontal de pacientes con mutaciones SOD1 no visto en otros casos ELAF o ELAE ¹¹².

El estudio en corteza motora, corteza parietal y cerebelo, mostró un aumento en las actividades de los complejos I y II-III en corteza motora, un incremento del complejo I en corteza parietal, y una disminución de la actividad del II-III en cerebelo. Estos cambios no se observaron en los casos ELAE ¹¹⁶. El mecanismo explicativo podría vincularse a una compensación frente al daño oxidativo, susceptible de afectar la membrana interna mitocondrial.

Varios estudios han demostrado aumento en la actividad del complejo IV en ELA ^{117,118}. En músculo esquelético se ha encontrado defecto de complejo IV ¹¹⁹ cuando previamente se había observado disminución de la actividad de los complejos I-III ¹²⁰.

Además se halló un caso con un déficit de actividad de complejo IV en músculo ⁵⁵, que resultó estar relacionado con una mutación en la subunidad I de la citocromo C oxidasa codificada en el ADNmt.

3.3.4 Genoma mitocondrial

Recientemente se han presentado evidencias que sugieren la presencia de mutaciones en el ADNmt en pacientes con ELA: deleciones múltiples y depleciones (disminución del ADNmt total) en músculo esquelético de pacientes con ELA ¹¹⁹, o deleciones únicas (concretamente deleción común de 4977 pb relacionada con la edad) en cerebro ¹²¹, con niveles superiores en corteza motora respecto a corteza temporal.

Los híbridos transmitocondriales generados mediante la fusión de células rho0 – sin mitocondrias – con plaquetas de pacientes con ELA, mostraron ultra estructura mitocondrial alterada, una disminución de la actividad de complejo I, aumento en la actividad de los enzimas antioxidantes y perturbación en la homeostasis del calcio ¹²².

3.3.5 Homeostasis de calcio

Se han observado niveles de calcio aumentados en linfocitos de pacientes con ELA esporádica ¹²³. Además se ha encontrado que las líneas celulares que expresan mutantes SOD1 producen una pérdida del potencial de membrana mitocondrial relacionado con el aumento de la concentración de calcio, lo que sugiere una reducción en la capacidad de la mitocondria para captar calcio ¹²⁴. También en híbridos se ha encontrado un aumento en la cantidad de calcio almacenado en la mitocondria ¹²². Sin embargo, in vivo se ha visto un aumento en los niveles de calcio, la mayor parte del cual se encuentra localizado en el interior de la mitocondria ¹²⁵.

3.3.6 Alteraciones en los niveles de SOD2

Los niveles de este enzima mitocondrial se han visto aumentados en neuronas ¹²⁶ y en astrocitos de la corteza motora y médula espinal ¹²⁷⁻¹²⁹. La actividad total del enzima no se ha visto alterada en homogeneizados de corteza motora ^{128,130}.

La expresión SOD2 también se ha estudiado fuera del sistema nervioso, hayando aumento en fibroblastos ¹³¹ o disminución en músculo esquelético en casos ELAE ¹¹⁹.

3.3.7 Evidencias provenientes de modelos de ratones transgénicos

En los ratones transgénicos que expresan diferentes mutaciones SOD1 ⁶⁹⁻⁷¹, se observó vacuolización en médula espinal ^{71,132,133}, derivada de mitocondrias anómalas, que representan características preclínicas de disfunción motora, con hallazgos de dilatación mitocondrial, y crestas desorganizadas o membranas externas fracturadas ¹³⁴.

Además, se observó que la administración de creatina a ratones transgénicos G93A SOD1 extendía su supervivencia de manera dosis dependiente ¹³⁵.

3.4 Otras teorías de trascendencia en la degeneración de neuronas motoras

Existen multitud de teorías relacionadas con la degeneración de neuronas motoras, sobre las que se han desarrollado múltiples estudios ¹⁶, como los ya descritos en los apartados previos. Debemos nombrar entre ellas las siguientes: teoría de la excitotoxicidad; desorganización de neurofilamentos intermedios; toxicidad de cobre; apoptosis y muerte neuronal selectiva; respuestas autoinmunes; implicación de los factores neurotróficos; teorías sobre infección viral; afectación de priones; metales pesados y otras toxinas.

OBJETIVOS

1. Seleccionar pacientes con enfermedad de motoneurona que cumplan los criterios diagnósticos de Esclerosis Lateral Amiotrófica. Estudiar su historia familiar.
2. Analizar el gen *SOD1* en el grupo de pacientes con ELA esporádica y en las familias con ELA familiar. También se incluirán los familiares de los que se disponga muestra biológica.
3. Estudiar la patogenicidad de las mutaciones en el gen *SOD1* mediante criterios estandarizados.
4. Realizar cultivos celulares primarios (fibroblastos) en pacientes con ELA esporádica y ELA familiar. En paralelo se cultivarán fibroblastos de sujetos control, de similar edad, sexo y zona geográfica.
5. Estudiar la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en los cultivos celulares primarios obtenidos.
6. Estudiar la actividad de los enzimas detoxificantes de radicales libres: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa en la muestra de estudio.
7. Estudiar la producción de radicales libres (especies reactivas de oxígeno), el estado de oxidación del glutatión y el potencial de membrana en la muestra de estudio.
8. Evaluar la presencia de alteraciones cuantitativas (depleción de ADN mt) y/o cualitativas (reagrupamientos de ADN mt) en fibroblastos de pacientes con ELA y controles, mediante análisis de Southern blot.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 Pacientes seleccionados para el estudio genético de SOD1

El estudio genético se llevó a cabo en una población de pacientes españoles con ELA esporádica (n=87) o ELAF (n=12).

El diagnóstico de ELA se estableció: i) mediante los criterios de 'El Escorial'⁴ ii) por la presencia de signos de neurona motora superior ó inferior en el caso de que otro familiar hubiera sido diagnosticado de ELA con anterioridad.

Los hallazgos clínicos de los pacientes en los que se encontraron mutaciones en el gen SOD1 se describen brevemente a continuación.

1.1 Familia A

Esta familia se caracteriza por un inicio temprano de la enfermedad (tercera década), elevada supervivencia (duración media de la enfermedad 17 años con un intervalo de 8 a 27 años), y un patrón de herencia autosómica dominante con alta penetrancia¹³⁶.

El fenotipo fue similar en todos los miembros afectados: inicio con debilidad de miembros inferiores y calambres asociados con signos de neurona motora inferior en el examen clínico. En un caso, la abolición de reflejos aquíleos precedió a la paresia en las piernas; en los otros casos, la pérdida de los reflejos aquíleos coincidió con una ligera a moderada debilidad en las piernas y signos de disfunción córticoespinal en los brazos.

La representación del árbol familiar se puede observar en la figura 5.

1.2 Familia B

El paciente de esta familia seleccionado para el estudio es una mujer de 58 años de edad que comenzó a mostrar debilidad muscular del miembro inferior izquierdo a la edad de 44 años. Tuvo una progresión muy lenta, con afectación de la pierna derecha a la edad de 45, el brazo derecho a los 50, y el brazo izquierdo a los 51. Aun es capaz de andar unos pasos con ayuda de un andador y no posee síntomas o signos bulbares excepto una incipiente debilidad facial. El examen neurológico mostró signos de neurona motora superior e inferior en los brazos y piernas (izquierdos más que derechos), sin tener otros sistemas afectados.

Su padre murió a la edad de 73 (tuberculosis pulmonar), y su madre murió a la edad de 62 (infarto de miocardio).

Tiene dos hermanos mayores (de 68 y 65 años de edad) y una hermana mayor de 71 años de edad) que son asintomáticos y con exámenes neurológicos normales.

No existe historia familiar de enfermedad neuromuscular. En particular, los padres no estaban relacionados con ningún familiar que tuviera una enfermedad similar.

El electromiograma mostró denervación parcial crónica generalizada, y reinervación en los músculos de las extremidades, con estudios de conducción sensorial y motora normales.

Tras el análisis molecular del paciente y su familia se encontró la mutación N65S SOD1 en dos miembros más de su familia como se describe en el apartado 2.2 de Resultados. La representación del árbol familiar se puede observar en la figura 7.

1.3 Familia C

La historia familiar es consistente con un patrón de herencia autosómica y dominante de elevada penetrancia. La edad media de inicio de los síntomas fue de 50,8 años de edad (con un intervalo de 37 a 66 años), y la duración media de la enfermedad fue de 2,8 años (con un intervalo de 1 a 4,5 años).

El fenotipo clínico entre los miembros de la familia varió entre inicio de síntomas bulbar y espinal.

Todos los pacientes tuvieron síntomas y signos de neurona motora superior e inferior.

La representación del árbol familiar se puede observar en la figura 9.

2 Análisis molecular

Las muestras de sangre de los pacientes, sus parientes y controles se tomaron tras la obtención del consentimiento informado.

El ADN se extrajo de acuerdo a procedimientos estándar (Nucleon BACC3 – Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, Inglaterra, Reino Unido).

2.1 SSCP y secuenciación

Se utilizó la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los cinco exones del gen *SOD1*¹³⁷, modificaciones en la tabla 4.

El cribaje molecular para buscar variaciones en la secuencia nucleotídica del gen, se realizó mediante la técnica de 'polimorfismos en la conformación de la cadena sencilla' (SSCP)^{138,139}.

Los productos de PCR se estudiaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante (6%) a temperatura ambiente y a 4 W durante 12 h, con posterior secado y exposición a una placa autorradiográfica para su revelado.

La secuencia de los fragmentos amplificados del gen *SOD1* humano se puede observar en el anexo 2. En los anexos 3 y 4 se detalla el código genético humano y la codificación nucleotídica y aminoacídica aceptada por la IUPAC.

Parejas de cebadores	T ^a de hibridación en PCR
EXÓN 1	
Cebador S: GTTTGCCTCGTAGTCTCCTGCA Cebador A: GCGGCCTCGCAAACAAGCCT	58 °C
EXÓN 2	
Cebador S: TTCAGAACTCTCTCCAACCTT Cebador A: CGTTTAGGGGCTACTCTACTGT	56 °C
EXÓN 3	
Cebador S: GAATGTATTTGGGAACCTTTAATT Cebador A: TAGATGAGTCAGCAAGTTCAAAAG	54,5 °C
EXÓN 4	
Cebador S: CATCAGCCCTAATCCATCTGA Cebador A: TCTTAGAAACCGCGACTAACAATC	57 °C
EXÓN 5	
Cebador S: GTATTGTTGGGAGGAGGTAGTGAT Cebador A: GCAGGATAACAGATGAGTTAAGGG	59 °C

Tabla 4

Características generales de las reacciones de PCR utilizadas en la amplificación del gen *SOD1* para su estudio en SSCP

Cada reacción de PCR se prepara en un volumen final de 10 µl con una concentración de cebadores de 0,5 pmol/µl; 200 µM de dATP, dGTP, dTTP y 25 µM de dCTP; y añadiendo 0,5 µCi de [α -³²P] dCTP (concentración final de MgCl₂ 1,5 mM). La programación de cada reacción de PCR es la siguiente: paso de desnaturización 1 min.; paso de hibridación 1 min.; paso de polimerización 1 min.; desarrollando reacciones de 30 ciclos en total.

Para la secuenciación, los productos de PCR no radiactiva (200 µM dCTP) se purificaron con un kit de purificación GFX PCR DNA (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey).

La reacción de secuenciación directa sobre los productos de PCR se llevó a cabo con el mismo conjunto de cebadores (sentido y antisentido) y el kit de secuenciación 'cycle dye terminator' (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Los productos de la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador ABI Prism 310 DNA (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.).

2.2 Análisis patogénico de las nuevas mutaciones encontradas

2.2.1 MUTACIÓN N65S SOD1:

Con el fin de analizar a gran escala (en la familia y en controles) la mutación A-G en el codon 65 de *SOD1*, se diseñó un cebador 'sentido' con secuencias despareadas (5'-TTATAAATAGGCTGTTCCAGTGCAGGTCCTCACTGTA-3'; el despareamiento se resalta en negrita) y un cebador 'antisentido' (5'-TAGATGAGTCAGCAAGTTCAAAAG-3') para amplificar mediante PCR un fragmento de 215 pares de bases (pb).

El despareamiento, en combinación con la secuencia normal, crea dos lugares de restricción para la endonucleasa *Tru 9I*, dando lugar a fragmentos de 121, 58 y 36 pb. La presencia de la mutación da lugar a la desaparición de uno de los lugares de restricción, con fragmentos de 121 y 94 pb (figura 2).

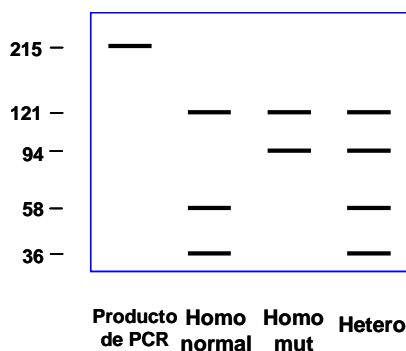


Figura 2: diagrama de los posibles resultados en el estudio de RFLP desarrollado para la mutación N65S de la proteína SOD1

Descripción: se diseñó un cebador modificado diferente a los utilizados para la realización de la PCR normal en el exón 3 de *SOD1*: MOD-E3Fw = 5'-CTTATAAATAGGCTGTACCAGTGCAGGTCCTCACTT-3'. De la PCR resultante se realiza un estudio de RFLP cortando el producto con el enzima " *Tru9I*".

Los fragmentos de este análisis de RFLP se separaron en geles de agarosa al 2,5% y se tiñeron con bromuro de etidio (figura 16).

2.2.2 MUTACIÓN I112M SOD1:

Para confirmar la presencia de la mutación C-G en el codon 112 (en la familia y en controles), se amplificó un producto de 245 pb mediante PCR (que incluye al exón 4 del gen *SOD1*) con un cebador intrónico 'sentido' (5'-CATCAGCCCTAATCCATCTGA-3') y un cebador intrónico 'antisentido' (5'-TCTTAGAAACCGCGACTAACAATC-3'). El producto de la amplificación mediante PCR se digirió con el enzima de restricción *Nla III*.

En la secuencia normal, el enzima produce tres fragmentos de 165, 43 y 37 pb, mientras que en el caso del ADN mutante, aparece un lugar de restricción adicional, dando lugar a fragmentos de 95, 70, 43 y 37 pb (figura 3).

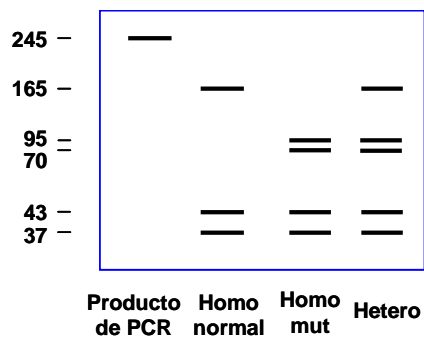


Figura 3: diagrama de los posibles resultados en el estudio de RFLP desarrollado para la mutación I112M de la proteína SOD1

Descripción del estudio de RFLP: se diseñó un experimento de RFLP consistente en el corte de los productos de PCR del exón 4 del gen *SOD1* con el enzima de restricción Nla III.

Los productos de digestión marcados con [α - 32 P] 2'-deoxicitidina 5'-trifosfato se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (10% acril/bis 19:1) tras lo que fueron secados y expuestos a una placa autorradiográfica para su posterior revelado (figura 17).

3 Cultivos de fibroblastos (Muestra de estudio)

La selección de los pacientes para la 'Muestra de estudio' fue posterior a la de los pacientes para la realización del análisis molecular.

Los criterios seguidos para la 'Muestra de estudio' determinaron incluir un grupo de pacientes ELAF, y un grupo mayoritario de pacientes ELAE. Pudieron obtenerse muestras (biopsia de piel) de 4 pacientes ELAF (uno de los ellos con la mutación N65S SOD1 y los otros tres sin mutación en dicho gen), de 17 pacientes ELAE y de 20 controles.

Como controles se seleccionaron pacientes sin evidencia clínica individual o familiar de enfermedad neurodegenerativa. Todas las muestras de los sujetos participantes en este estudio se realizaron tras la obtención de consentimiento informado.

Las biopsias de piel se procesaron inmediatamente mediante métodos físicos para la preparación de explantes a partir de los cuales se obtuvieron las diferentes líneas de fibroblastos.

Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células crecieron en un medio de Eagle con modificaciones de Dulbecco (DMEM) suplementado

con suero fetal bovino al 10%, glutamina 4mM, antibióticos (penicilina 100 µg/ml y estreptomicina 100 µg/ml) y antifúngico (anfotericina B 250 µg/ml). Se efectuaron dos tipos de crecimiento que aparecen comentados en los resultados: con adición de glucosa 1g/l; con adición de galactosa 1g/l.

4 Estudios bioquímicos en los cultivos de fibroblastos

4.1 Estudio de la cadena respiratoria mitocondrial

Las enzimas de la fosforilación oxidativa se estudiaron en fibroblastos crecidos en confluencia en dos botellas de 175 cm² de base. Tras eliminar el medio por centrifugación, las células se resuspendieron en amortiguador KP 20 mM homogeneizándose mediante ultrasonidos con un sonicador. Se efectuaron dos etapas de disrupción intermitentes de quince segundos manteniendo la suspensión a 0°C.

Las actividades de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial se estudiaron por duplicado ¹⁴⁰, en un espectrofotómetro DU-68 (Beckman Instrument). Resumiendo, el complejo I (NADH CoQ oxidoreductasa sensible a rotenona) se determinó mediante la oxidación de NADH a 340 nm en tampón fosfato 20 mM pH=8, NADH 0.2 mM, NaN₃ 1 mM, BSA-EDTA 0.1% y CoQ₁ 200 µM. La reacción se inhibió entre un 90-100% tras añadir rotenona 5µM. El complejo II (succinato deshidrogenasa) se determinó a través de la oxidación del succinato (32 mM) a 600 nm, en un tampón fosfato 50 mM pH=7, KCN 1.5 mM y CoQ₁ 50 µM, en presencia del aceptor artificial de electrones 2,6 diclorofenol-indofenol 0.1 mM. El complejo III (QH₂ citocromo c reductasa sensible a antimicina), fue analizado por la reacción de reducción del citocromo c a 550 nm, en una mezcla de tampón fosfato 50 mM pH=7.5, NaN₃ 2 mM, BSA-EDTA 0.1%, citocromo c 1 mM y 50 µM de decilubiquinol (DBH₂). La reacción se inhibió entre un 75-90% tras la adición de 10 µL de antimicina A (1 mg en etanol al 50%). La actividad del complejo IV se midió a través de la disminución de la absorbancia a 550 nm del citocromo c reducido (80 µM) en una solución con tampón fosfato 10 mM pH=7. El complejo V se monitorizó mediante la extinción de ATP 2.5 mM, en un medio con tampón Hepes-Mg 50 mM pH= 8, NADH 0.2 mM, fosfoenol-piruvato 2.5 mM, al que se añadió 5 µl de piruvato kinasa (10 mg/mL) y 10 µL de lactato deshidrogenasa (5 mg/mL) en presencia de antimicina A (0.2 mg/mL en etanol al 50%). La fracción sensible a oligomicina se valoró añadiendo 10 µL de oligomicina (0.2 mg/mL en etanol al 50%).

La temperatura de incubación fue de 30 °C para todas las reacciones excepto para el complejo IV que fue de 38 °C, siendo el volumen final en todas ellas de 1 mL.

Las actividades enzimáticas específicas se normalizaron en función de la actividad de la citrato sintasa (CS), enzima de matriz que constituye un marcador de la riqueza mitocondrial. La actividad de CS se cuantificó mediante el cambio de absorbancia a 412 nm producida por la reacción del DTNB (ácido 5-5´ ditiono bis 2-nitrobenzoico) 100 µM con coenzima A libre formado por la condensación del acetil-CoA (350 µg/mL) con el oxalacetato 0.5 mM, en una solución con tampón Tris-HCl 75 mM pH=8 y tritón X-100 al 0.1 %.

La medida del contenido proteico total se realizó por el método de Lowry modificado (10 µl de suspensión en 290 µl de agua).

4.2 Medida del coenzima Q mediante HPLC

Las concentraciones de coenzima Q se determinaron mediante una técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica. El método utilizado fue el descrito por Langedijk ¹⁴¹ con algunas modificaciones.

Los fibroblastos crecidos en confluencia en dos botellas de 175 cm² de base. Tras eliminar el medio por centrifugación, las células se resuspendieron en 1 ml de SDS 0,1 M con 50 µl de etanol con BHT (butilhidroxitolueno) (10mg/ml) homogeneizándose mediante ultrasonidos. Se transfiere a un tubo de 10 ml y se añaden 2 ml de etanol y 2 ml de hexano. Se mezcla 2 minutos en vórtex y se centrifuga 5 min. a 1000 g, y 1 ml de la capa orgánica se transfiere a otro tubo y se seca bajo corriente de N₂. Se redisuelve en metanol-reagent alcohol (1:1,v/v) en 0,2-1ml dependiendo de la concentración. Los extractos no son estables más de 2 horas a -20°C.

La fase estacionaria fue una columna de fase reversa (HR-80 RP-C₁₈, 80 x 4,6 mm. ESA Inc). La fase móvil se preparó disolviendo 7 g de NaClO₄·H₂O en 1000 ml de metanol/propanol/HClO₄ 70%, 700,8:200:0,2 (vol/vol), y el flujo se fijó en 0,8 ml/min. Se programaron idénticas condiciones para el detector electroquímico y la válvula postcolumna. El sistema fue controlado mediante un ordenador (Kromasystem 2000, Kontron Instruments). Se realizaron inyecciones en una válvula de inyección (Model 7161, Rheodyne, Cotaty, EE.UU.) con una jeringa Hamilton de 100 µl (Bonaduz, Suiza). Se utilizó ubiquinona como estándar externo de calibración.

La variación de los tiempos de retención para CoQ₁₀ y CoQH₂ fueron respectivamente del 5% y 3,2%, y la precisión interdía del 9,2% y 6,3%. El grado de recuperación de CoQ₁₀ se situó entre el 88% y el 93%. Las medidas de CoQ₁₀ se expresaron en nmol/l.

4.3 Determinación de la concentración de ATP celular

Se realizó en fibroblastos en confluencia mediante un procedimiento estandarizado de bioluminiscencia para células somáticas (Sigma Chemical Company. P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178 USA).

En resumen, alrededor de 10.000 células viables se resuspendieron en 50 µl de PBS 1X, diluyéndose en 50 µl de agua destilada estéril pH 7,8 añadiendo posteriormente 100 µl de reactivo "liberador de ATP para células somáticas". Tras agitación vigorosa, la mezcla se transfirió a otro tubo con 100 µl del reactivo "mezcla de ATP". Midiéndose el porcentaje de luz emitida durante 20 segundos en el luminómetro.

Siguiendo las mismas condiciones descritas, se hizo otra medida para estimar el ATP endógeno; a 50 µl de solución celular se le añadieron 50 µl de una dilución de ATP realizada a partir de un estándar de concentración conocida (0,2 mM). El porcentaje de ATP de cada muestra se calculó según la ecuación: $(\text{ATP obtenido junto con la dilución del estándar} * \text{Luz emitida por la muestra}) / (\text{Luz emitida por la muestra con el estándar interno} - \text{Luz emitida por la muestra})$. Los datos se expresaron en fmol de ATP/ célula viable.

4.4 Medida de la actividad de los enzimas antioxidantes

La preparación de los fibroblastos para la valoración de las tres enzimas antioxidantes se realizó tras tripsinización de las células, eliminación del medio y lavado con PBS. Manteniendo todo el procedimiento a 0°C hasta la lectura espectrofotométrica. Finalmente se resuspenden en tampón de homogeneización: Tris-HCl 10 mM con 0,25 mM de sacarosa. El precipitado se sonica sobre hielo 3 veces durante 15 segundos, dejando un periodo de reposo de 30 segundos entre cada etapa. Se centrifuga posteriormente a 10 min a 11800 g y 4°C y se miden las actividades enzimáticas y la cantidad de proteína (método de Lowry) en el sobrenadante.

4.4.1 Superóxido dismutasa

Las actividades SOD2 (Mn-SOD) y SOD total se determinaron según el método basado en la reducción de nitroblue tetrazolium (NBT) por los radicales superóxido¹⁴². La xantina oxidasa se usa como generador de EROs.

La actividad SOD2 se distingue de la SOD1 (Cu/Zn SOD) en su sensibilidad al cianuro, inactivándose tras la adición de NaCN 5mM.

En la mezcla de reacción (1 ml) se añaden 100 µl de Xantina 0,15 mM, 100 µl de NBT 0,6 mM, 100 µl de ácido dietilentriaminopentaacético 1mM, 1 unidad de catalasa,

albúmina (BSA) sin ácidos grasos 0,13 mg (100 µl), ácido batocuprodisulfónico disódico 0,25 mM (10 µl) y búfer fosfato pH 7,8 100 mM (485 µl). Tras 3 minutos de preincubación con 100 µl de muestra, se añaden 0,1 unidades de xantina oxidasa y se mide la absorbancia a 560 nm a temperatura ambiente.

Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima (en microgramos) que reduce la velocidad de reducción de NBT en un 50%.

4.4.2 Catalasa

Para la medida de la actividad catalasa se utilizó un método espectrofotométrico basado en la variación de la absorbancia al descomponerse el H₂O₂ ¹⁴³.

La muestra se diluye 1/100 en amortiguador fosfato 50mM pH 7,0. Se añade H₂O₂ 60 mM (csp 3 ml). Se realiza la medida de la absorbancia a 240 nm durante un tiempo de reacción de 30 segundos.

4.4.3 Glutation peroxidasa

La determinación de la actividad glutacion peroxidasa se realizó mediante un método espectrofotométrico a 340 nm y 37°C ¹⁴⁴, en presencia y ausencia de peróxido de tercbutilo para eliminar la oxidación de NADPH dependiente de hidroperóxidos.

Inicialmente se mezclan 60 µl de una solución 4 mM de ferricianuro potásico / 20 mM NaCN para evitar la interferencia de la hemoglobina en el ensayo.

La mezcla de reacción contiene GSH 1 mM, 2 unidades de glutacion reductasa, NADPH 0,2 mM y tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 1mM EDTA. Tras 10 minutos de preincubación se efectúa la medida de la absorbancia durante 4 minutos.

La actividad de la GPx se calcula como velocidad global de la oxidación del NADPH menos la velocidad de la oxidación independiente de hidroperóxidos menos el valor del blanco.

5 Estudios celulares en los cultivos de fibroblastos

5.1 *Determinación de la cantidad relativa de especies reactivas de oxígeno*

Esta medida se efectuó mediante la utilización de la dihidrorrodamina-123 (DHR123, Molecular Probes), que sufre una oxidación en el interior de la célula para dar lugar a la molécula fluorescente rodamina-123 en presencia de radicales libres ¹⁴⁵.

La DHR-123 se añade a tubos que contengan aproximadamente 100.000 células (previamente lavadas) en 200 µl, hasta una concentración de 100 µM. Esta suspensión se

mantiene durante 30 minutos a 37°C en presencia de una atmósfera al 5% de CO₂. Se contaron al menos 10.000 células en cada caso, analizándose los canales FL1 y FL2. Las células muertas y los restos celulares se excluyeron del análisis mediante selección parcial en las gráficas de medición forward y side scatter del citómetro (Coulter Epics® Elite).

5.2 Determinación de la concentración de glutatión

La medida de los tioles celulares no proteicos en células individuales mediante citometría de flujo se puede realizar usando el reactivo naranja de mercurio (compuesto de mercurio que se une estequiométricamente a los grupos sulfidril) ¹⁴⁶.

Las células se utilizaron en la fase de crecimiento exponencial. Una vez lavadas, se contaron y resuspendieron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a una concentración final de 1x10⁶ céls/ml. A esta suspensión se añade naranja de mercurio (Sigma Aldrich) 100 µM en acetona (almacenado a 4°C). Tras centrifugación, las células se resuspenden en 1 ml de PBS manteniéndolas en hielo, tras lo que se pasan a través del capilar del citómetro utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm y una de emisión de 575 nm.

Como en los procedimientos habituales, las células muertas y los restos celulares se separaron de la medición mediante el uso de las señales forward y side scatter para efectuar una selección parcial de la población en las mediciones del citómetro (Coulter Epics® Elite).

5.3 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Esta medida se realizó mediante la utilización del compuesto fluorescente JC-1, que forma compuestos agregados en el interior de la matriz mitocondrial. El monómero de este compuesto emite a 520 nm (verde) tras excitación a 490 nm cuando el potencial de membrana en la mitocondria es negativo. Si el potencial de membrana varía, los agregados de JC-1 que se forman pasan a emitir a 585 nm (naranja).

El compuesto JC-1 se solubiliza en una solución stock con DMSO. Dicha solución añadiéndose PBS para obtener una concentración 5 µg/ml de JC-1. Aproximadamente 2 millones de células (previamente centrifugadas y lavadas en PBS) se resuspenden en 1 ml de la solución de PBS con JC-1 a 37°C durante 20 minutos, se lavan 2 veces con PBS (2 ml) y se resuspenden de nuevo en este medio antes de la medida en el citómetro ¹⁴⁷.

La fluorescencia se analizó en el canal FL1 para el monómero fluorescente y FL2 para los agregados. Se contaron al menos 10.000 células en cada caso. Las células

mueras y los restos celulares se excluyeron del análisis mediante selección parcial en las gráficas de medición forward y side scatter del citómetro (Coulter Epics® Elite).

6 Detección de deleciones y depleción en el ADN mitocondrial

La extracción de ADN en las líneas celulares se realizó mediante métodos convencionales (Nucleon BACC3 – Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, Inglaterra, Reino Unido).

Se partió de 5-10 µg de ADN total procedente de fibroblastos. Estas alícuotas fueron digeridas durante una hora y media a 37 °C con 20 U del enzima *Pvu* II en un volumen final de reacción de 40 µl. Los fragmentos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% durante toda la noche, a bajo voltaje (35 V), en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X. El ADN fue posteriormente transferido a una membrana Zeta-probe siguiendo el protocolo descrito en el DIG DNA Labeling and Detection kit (Roche Diagnostics). Como sondas se utilizaron dos fragmentos del ADNmt amplificados mediante PCR, utilizando los cebadores siguientes: a) 1562F (entre los nucleótidos 5´-1562-1581-3´ de la secuencia consenso) y 3717R (5´-3717-3701-3´); b) 13809F (5´-13809-13828-3´) y 16547R (5´-16547-16527-3´). Estos fragmentos, una vez purificados mediante PCR y gel Band Purification kit (Amersham-Pharmacia), se marcaron siguiendo las especificaciones del kit de marcaje y detección. Una vez reveladas las membranas, la señal obtenida fue valorada densitométricamente utilizando un analizador de imágenes SunSoft (Pharmacia).

En el caso del análisis de depleción de ADNmt se marcó en las mismas condiciones un fragmento del gen humano que codifica la subunidad 18S del ARNr amplificado por PCR. Los cebadores utilizados en la amplificación del gen *18S ADNr* son: (sentido) 18S50F 5´-ATGCATGTCTAAGTACGCA-3´ y (antisentido) 18S1737R 5´-TCACTAAACCATCCAATCG-3´.

En este caso la cuantificación se realizó siguiendo métodos descritos¹⁴⁸.

7 Análisis estadístico

Para comprobar los resultados obtenidos se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

RESULTADOS

1 Selección de pacientes

Los pacientes con sospecha de ELA se diagnosticaron por los criterios de 'El Escorial' ⁴. En el caso de existencia de un familiar con diagnóstico de ELA, la presencia de signos de NMS ó NMI fueron suficientes para tipificar la enfermedad.

Tras consentimiento informado se extrajo una muestra de sangre a los pacientes.

Se seleccionaron y analizaron 87 pacientes con ELAE y 12 con ELAF, estos últimos pertenecían a 11 familias no relacionadas de manera directa.

La edad de inicio de la enfermedad, la media de duración de la misma y los síntomas de inicio se muestran en las siguientes tablas:

	ELAE	ELAF
Edad media (años)	56,2 ± 16,3	43,5 ± 11,5
Intervalo	(28 a 76)	(29 a 60)
	ELAE	ELAF
Evolución hasta el momento de la extracción (años)	2,3 ± 1,8	3,6 ± 1,2
Intervalo	(0,5 a 6)	(0,3 a 7)
	ELAE	ELAF
Síntomas bulbares en el inicio	28,7 %	25 %
Síntomas espinales en el inicio	71,3 %	75 %

Tabla 5

Características de los pacientes incluidos en el estudio genético de *SOD1*

2 Estudio molecular del gen SOD1

2.1 SSCP

En los estudios de SSCP las bandas observadas en la electroforesis corresponden a fragmentos de ADN con conformación tridimensional en condiciones no desnaturizantes.

En el caso de heterocigosis las bandas identificadas serían las correspondientes a la doble de cada fragmento y a las diferentes conformaciones tridimensionales que

adquiere cada banda sencilla. De este modo se podrían observar hasta 4 bandas diferentes.

Los fragmentos de ADN normales (homocigotos), darán un patrón de bandas idéntico (normal). En el caso de mutaciones heterocigotas u homocigotas, aparecerá un patrón de bandas diferente (mutante), impredecible, y no relacionado con el tamaño de las bandas.

En nuestros pacientes, se identificaron los siguientes patrones electroforéticos diferentes a los de los controles:

- Exón 2: una banda en el fragmento correspondiente al exón 2 en un paciente ELAE, que resultó ser un polimorfismo en la posición 27 correspondiente a un cambio de A por G: GGA > GGG. Ambos codones se traducen por el aminoácido glicina.
- Intrón 3: una banda en el fragmento correspondiente al exón 3 en un paciente ELAE, que provenía de un cambio G por C en la secuencia intrónica entre los exones 3 y 4 (IVS3+25G>C). En este caso no se encontraron presumibles alteraciones del procesamiento del ARNm.
CAttgttctacgaattgagaacattaGttaccgctatgcaaaga.
- Exón 2: una banda en el fragmento correspondiente al exón 2 en pacientes ELAF, miembros de la familia A (figura 4). Esta mutación G por A cambio produce el cambio aminoacídico G37R en la secuencia del enzima SOD1 (figura 11). La representación del árbol familiar se puede observar en la figura 5.

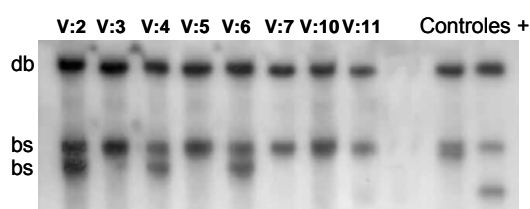


Figura 4: Análisis mediante sscp del exón 2 del gen *SOD1* en 8 miembros de la familia A
Izquierda: posición de las diferentes conformaciones del ADN en este experimento. bs: banda sencilla; db: doble banda

- Exón 3: una banda en el fragmento correspondiente al exón 3 en un paciente ELAE (figura 6). La familia de este paciente (39P), fue a su vez estudiada con la nomenclatura de familia B. El cambio nucleotídico A por G produce el cambio aminoacídico N65S en la secuencia del enzima SOD1 (Figura 13). La representación del árbol familiar se puede observar en la figura 7.

Familia A

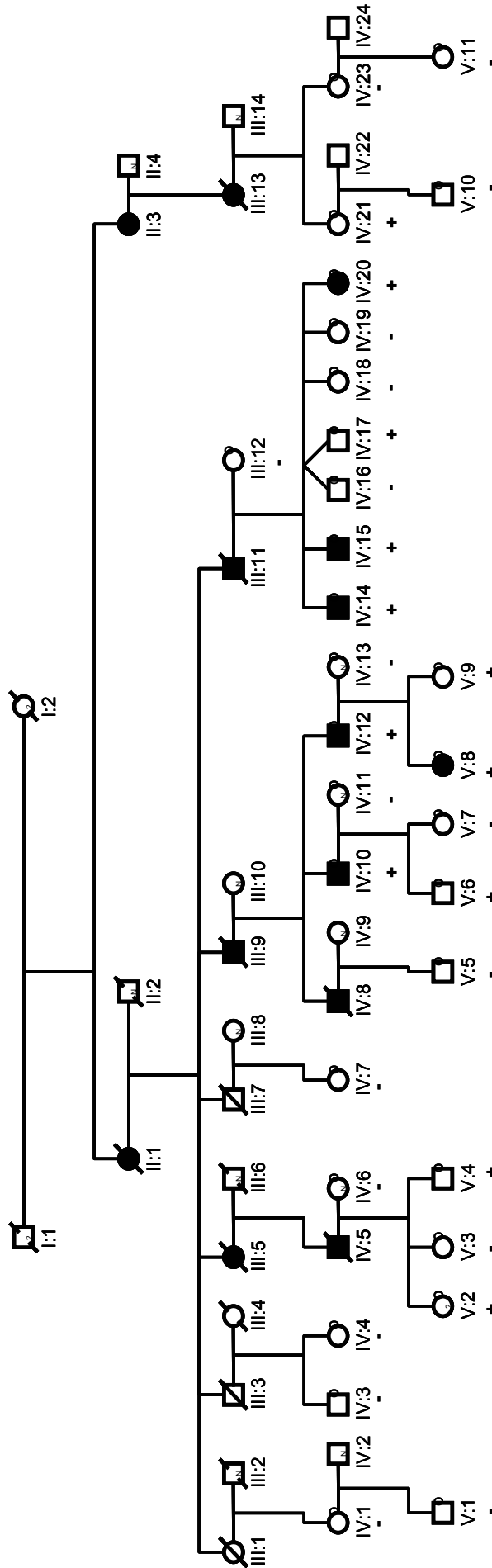


Figura 5: Árbol de la familia A con la mutación G37R.

Símbolos: número de pedigrí (V:2 – bajo cada uno de los miembros de la familia, indica la generación a la que pertenece y el número asignado en cada generación); 'cuadrado' > hombre; 'círculo' > mujer; 'y' > fallecido; 'símbolo relleno' > paciente; 'un punto en el interior de un símbolo' > portador; 'una "n" en el interior de un símbolo' > no afecto; 'un pequeño círculo cercano a un símbolo' > individuo de que se dispone de muestra de ADN; '+ ' > miembro de la familia en que se ha encontrado la mutación; '- ' > miembro de la familia en que no se ha encontrado la mutación

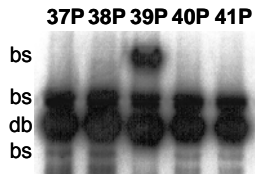


Figura 6: Análisis mediante sscp del exón 3 del gen *SOD1* en 5 pacientes ELAE, incluyendo el paciente II:1 (39P) en que se encontró la mutación N65S

Izquierda: posición de las diferentes conformaciones del ADN en este experimento. bs: banda sencilla; db: doble banda

Familia B

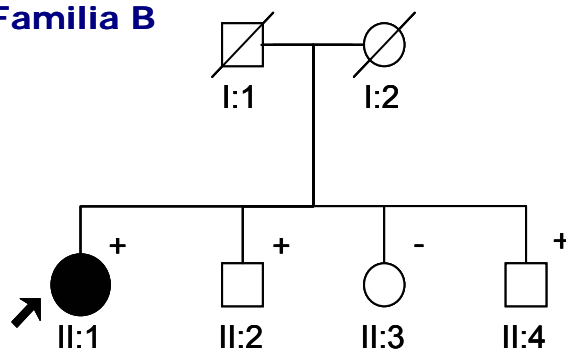


Figura 7: Árbol de la familia B, correspondiente a los familiares del paciente ELAE en que se localizó la mutación N65S.

Símbolos: número de pedigrí (II:2 – bajo cada uno de los miembros de la familia, indica la generación a la que pertenece y el número asignado en cada generación); 'cuadrado' > hombre; 'círculo' > mujer; '/' > fallecido; 'símbolo relleno' > paciente; 'un punto en el interior de un símbolo' > portador; 'una "n" en el interior de un símbolo' > no afecto; 'un pequeño círculo cercano a un símbolo' > individuo de que se dispone de muestra de ADN; '+' > miembro de la familia en que se ha encontrado la mutación; '-' > miembro de la familia en que no se ha encontrado la mutación

- Exón 4: una banda en el fragmento correspondiente al exón 4 en pacientes ELAF, miembros de la familia C (figura 8). Este cambio C por G produce el cambio aminoacídico I112M en la secuencia del enzima SOD1 (figura 15). La representación del árbol familiar se puede observar en la figura 9.

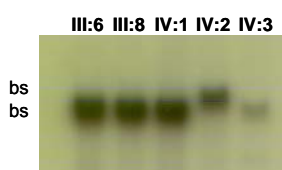
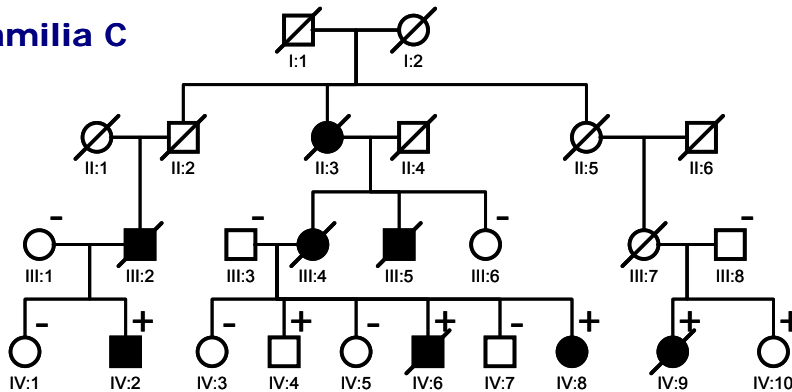


Figura 8: Análisis mediante sscp del exón 4 del gen *SOD1* en 5 miembros de la familia C

Izquierda: posición de las diferentes conformaciones del ADN en este experimento. bs: banda sencilla; db: doble banda

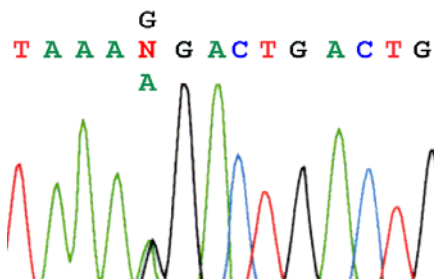
Familia C**Figura 9:** Árbol de la familia C donde se localizó la mutación I112M

Símbolos: número de pedigrí (V:2 – bajo cada uno de los miembros de la familia, indica la generación a la que pertenece y el número asignado en cada generación); 'cuadrado' > hombre; 'círculo' > mujer; '/' > fallecido; 'símbolo relleno' > paciente; 'un punto en el interior de un símbolo' > portador; 'una "n" en el interior de un símbolo' > no afecto; 'un pequeño círculo cercano a un símbolo' > individuo de que se dispone de muestra de ADN; '+' > miembro de la familia en que se ha encontrado la mutación; '-' > miembro de la familia en que no se ha encontrado la mutación

2.2 Secuenciación

En los casos en los que se produjo un cambio en el patrón electroforético en el estudio de sscp, se procedió a secuenciar el fragmento alterado. Sólo se describen a continuación las secuencias que dieron lugar a mutaciones.

En la familia A en el exón 2 se identificó la transición GGA-AGA que produce un cambio del muy conservado residuo de glicina por una arginina (G37R) (figura 10). Todos los pacientes analizados en esta familia fueron portadores de la mutación.

**Figura 10:** fragmento de la secuencia del exón 2 obtenida en el paciente V:2 de la familia A con la mutación G37R.

Electroforegrama obtenido mediante secuenciación automática en el analizador ABI PRISM

35	36	37	38	39	40	(posición en la secuencia aminoacídica del enzima SOD1)
I	K	G	L	T	E	Secuencia normal
att	aaa	gga	ctg	act	gaa	
att	aaa	aga	ctg	act	gaa	
I	K	R	L	T	E	Secuencia mutante

Figura 11: cambios comparativos producidos en las secuencias nucleotídicas (ADN) y aminoacídicas (proteína) en el gen *SOD1* y enzima SOD1 respectivamente, en el caso de la mutación G37R

El paciente perteneciente a la familia B, que era aparentemente ELAE, mostró una substitución no descrita AAT-AGT en el exón 3 que produce un cambio del residuo conservado de asparragina por serina (N65S) (figura 12). Esta mutación se encontró también en dos de sus hermanos (figura 7).

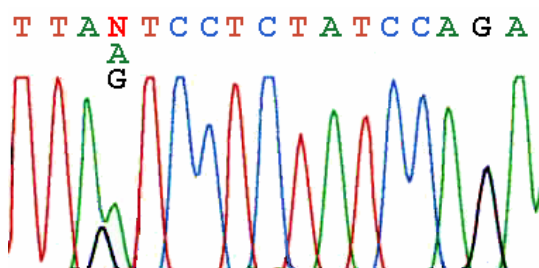


Figura 12: fragmento de la secuencia del exón 3 obtenida en el paciente II:1 de la familia B con la mutación N65S.

Electroforegrama obtenido mediante secuenciación automática en el analizador ABI PRISM

64	65	66	67	68	69	(posición en la secuencia aminoacídica del enzima SOD1)
F	N	P	L	S	R	Secuencia normal
ttt	aat	cct	cta	tcc	aga	
ttt	agt	cct	cta	tcc	aga	
F	S	P	L	S	R	Secuencia mutante

Figura 13: cambios comparativos producidos en las secuencias nucleotídicas (ADN) y aminoacídicas (proteína) en el gen *SOD1* y enzima SOD1 respectivamente, en el caso de la mutación N65S.

En la familia C, encontramos en el exón 4 la nueva mutación ATC-ATG que cambia el residuo conservado de isoleucina por una metionina (I112M). Figura 14.

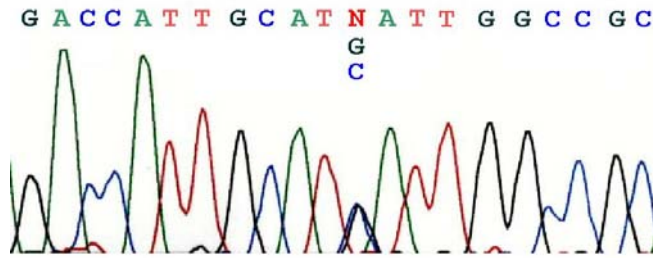


Figura 14: fragmento de la secuencia del exón 4 obtenida en el paciente IV:9 con la mutación I112M. Electroforegrama obtenido mediante secuenciación automática en el analizador ABI PRISM

109 110 111 112 113 114 115 (posición en la secuencia aminoacídica del enzima SOD1)

D	H	C	I	I	G	R	Secuencia normal
GAC	cat	TGC	atc	ATT	ggc	cgc	
GAC	cat	TGC	atg	ATT	ggc	cgc	
D	H	C	M	I	G	R	Secuencia mutante

Figura 15: cambios comparativos producidos en las secuencias nucleotídicas (ADN) y aminoacídicas (proteína) en el gen *SOD1* y enzima SOD1 respectivamente, en el caso de la mutación I112M

En total se encontraron mutaciones en el gen *SOD1* en dos de las once familias (18%) con ELA. Uno de los pacientes con ELA esporádica estudiados portaba una mutación en el mismo gen (1,15%).

3 Estudios de patogenicidad

Con el fin de estudiar la patogenicidad de las nuevas mutaciones encontradas (N65S e I112M) en el gen *SOD1*, se realizaron estudios encaminados a discriminar polimorfismos y evaluaciones de la conservación de la secuencia del enzima en la escala evolutiva.

3.1 RFLP

Para la discriminación de posibles polimorfismos se llevó a cabo el diseño de técnicas de RFLP mediante las cuales se pudiera estudiar un número de individuos elevado, con menos coste económico y temporal, para cada una de las nuevas mutaciones encontradas en el gen *SOD1*.

Se efectuaron en los pacientes y sus familias los estudios de RFLP para comprobar la correlación del defecto genético con el fenotipo clínico y el grado de penetrancia de la mutación.

Del mismo modo se efectuó el mismo estudio de RFLP en un grupo de pacientes control entre los que se incluyeron pacientes con otras enfermedades neurodegenerativas y sujetos sanos (al menos 50) para descartar la posibilidad de la existencia de la mutación como un polimorfismo en la población general. Ninguno de los ADN de los sujetos control mostró los cambios que se observaban en los pacientes.

La figura 16 muestra el análisis de PCR-RFLP en los hermanos de la paciente II:1 de la familia B, así como en controles.

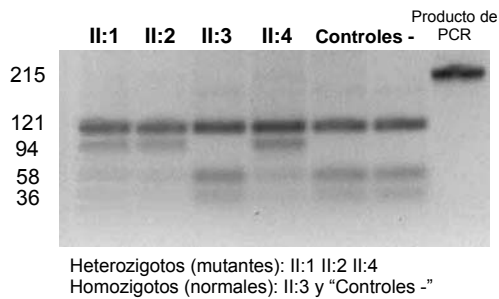


Figura 16: análisis mediante RFLP del paciente II:1 de la familia B, y sus hermanos
Izquierda: pares de bases de los fragmentos obtenidos en el estudio de RFLP

En la figura 17 se muestra el análisis de PCR-RFLP en los miembros de la familia C, así como en controles.

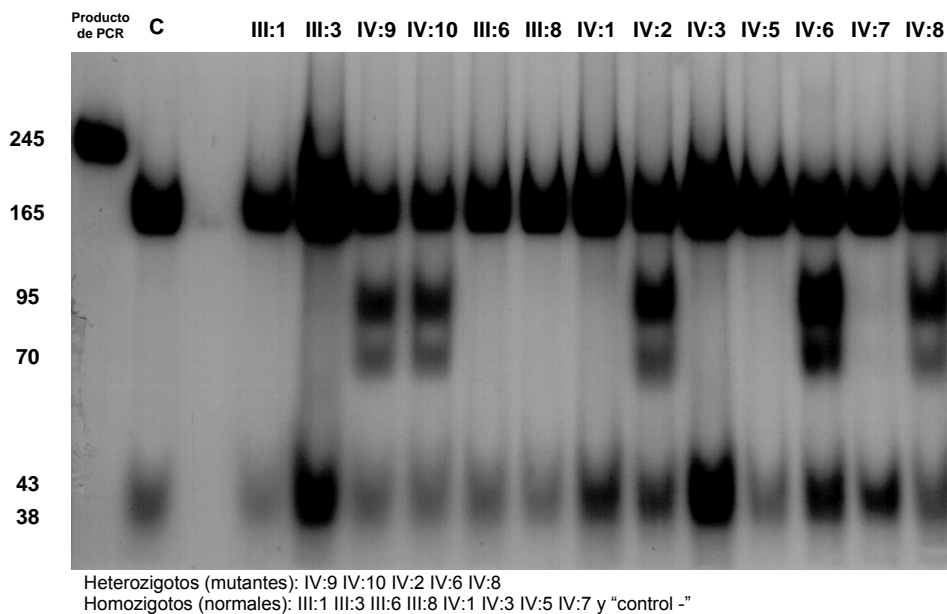


Figura 17: estudio de RFLP de 5 miembros de la familia C con la mutación I112M
Izquierda: pares de bases de los fragmentos obtenidos en el estudio de RFLP

3.2 Estudios en la escala evolutiva

El estudio de la secuencia aminoacídica del enzima SOD1 en las posiciones 65 y 112 se llevó a cabo mediante la utilización de las Bases de Datos Gapped BLAST y PSI-BLAST¹⁴⁹. Los resultados de dicho estudio se pueden observar en las figuras 18 y 19.

		65														
Homo sapiens	T	S	A	G	P	H	F	N	P	L	-	S	R	K	H	G
Bos taurus	T	S	A	G	P	H	F	N	P	L	-	S	K	K	H	G
Cervus elaphus	T	S	A	G	P	H	F	N	P	L	-	S	K	K	H	G
Sus scrofa	T	S	A	G	P	H	F	N	P	E	-	S	K	K	H	G
Oryctolagus cuniculus	T	S	A	G	P	H	F	N	P	L	-	S	K	K	H	G
Cavia porcellus	T	S	A	G	P	H	F	N	P	L	-	S	K	K	H	G
Mus musculus	T	S	A	G	P	H	F	N	P	H	-	S	K	K	H	G
Gallus gallus	T	S	A	G	A	H	F	N	P	E	-	G	K	Q	H	G
Prionace glauca	I	S	A	G	P	H	Y	N	P	F	-	S	K	N	H	G
Drosophila melanogaster	M	S	S	G	P	H	F	N	P	Y	-	G	K	E	H	G
Zea mays	M	S	T	G	P	H	F	N	P	V	-	G	K	E	H	G
Aspergillus japonicus	M	S	T	G	P	H	F	N	P	T	-	G	K	E	H	G
Schizosaccharomyces pombe	T	S	A	G	P	H	F	N	P	L	-	S	R	K	H	G
Haemophilus parainfluenzae	L	A	A	G	G	H	W	D	P	K	G	A	K	Q	H	G
Escherichia coli	E	S	A	G	G	H	L	D	P	Q	N	T	G	K	H	E

Figura 18: Comparación de la evolución de la SOD1 en el fragmento que rodea la Asn de posición 65 de la proteína. En bacteria la secuencia corresponde al precursor de la proteína en lugar de la forma madura de la enzima.

		112												
Homo sapiens	S	L	S	G	D	H	C	I	I	G	R	T	L	V
Bos taurus	S	L	S	G	E	Y	S	I	I	G	R	T	M	V
Cervus elaphus	S	L	S	G	E	H	S	I	I	G	R	T	M	V
Sus scrofa	A	L	S	G	D	H	S	I	I	G	R	T	M	V
Oryctolagus cuniculus	S	L	S	G	D	M	S	V	I	G	R	T	L	V
Cavia porcellus	S	L	S	G	A	N	S	I	I	G	R	T	M	V
Mus musculus	S	L	S	G	E	H	S	I	I	G	R	T	M	V
Gallus gallus	S	L	T	G	P	H	C	I	I	G	R	T	M	V
Prionace glauca	H	L	S	G	E	R	S	I	I	G	R	T	L	V
Drosophila melanogaster	T	L	F	G	A	D	S	I	I	G	R	T	V	V
Zea mays	P	L	A	G	P	H	S	I	I	G	R	A	V	V
Aspergillus japonicus	P	L	T	G	A	H	S	I	I	G	R	A	V	V
Schizosaccharomyces pombe	S	L	S	G	D	H	C	I	I	G	R	T	L	V
Haemophilus parainfluenzae	K	K	L	D	E	-	-	V	R	G	H	S	I	M
Salmonella typhimurium	S	L	S	E	-	-	-	L	K	G	H	S	L	T
Escherichia coli	S	L	D	E	-	-	-	I	K	D	K	A	L	M

Figura 19: Comparación de la evolución de la SOD1 en el fragmento que rodea a la Ile de posición 112 en la proteína. En bacteria la secuencia corresponde al precursor de la proteína en lugar de la forma madura de la proteína.

En ambas figuras los colores representan la conservación aminoacídica de las secuencias:

- Amarillo: aminoácido afectado por la nueva mutación en el gen SOD1
- Azul: posiciones conservadas en la escala filogenética
- Gris: aminoácidos con propiedades de polaridad similares al de la secuencia humana normal

4 Realización de la 'Muestra de estudio'

'Muestra de estudio': referida al grupo de pacientes a partir de los que se han obtenido líneas celulares primarias (fibroblastos), para su posterior cultivo y sucesivos procesamientos con el fin de realizar estudios bioquímicos y celulares.

Para la preparación de la 'Muestra de estudio', se llevó a cabo una selección de pacientes y controles similares en sexo y edad.

Las características clínicas de la 'Muestra de estudio' en cuanto a edad, sexo, y la duración de la enfermedad, antecedentes familiares, estudios genéticos y síntomas de inicio se muestran en las siguientes tablas:

	ELA	Controles
Edad media (años)	52,05 ± 14,11	57,92 ± 10,75
Muestras seleccionadas	21	20
Hombres	12	9
Mujeres	9	11

Los controles fueron estudiados desde el punto de vista clínico en la consulta de neurología, valorando su historia familiar.

	ELA
Duración de la enfermedad (años)	1,8 ± 1,7
Síntomas de inicio espinales	80,96 %
Síntomas de inicio bulbares	19,04 %

Tres casos fueron considerados ELAF por pertenecer a una familia en que se habían dado más casos de la enfermedad. En ninguno de ellos se encontraron mutaciones en el gen SOD1. En la muestra de estudio fue incluido el paciente II:1 de la familia B, con la mutación N65S en el enzima SOD1.

	3EL	15EL	17EL	19EL
Antecedentes familiares	No	Sí	Sí	Sí
Estudio genético	Mutación N65S SOD1	Neg	Neg	Neg

Tablas 6, 7 y 8

Características de los pacientes incluidos en los estudios bioquímicos y celulares – Muestra de estudio

En todos los pacientes seleccionados se realizó una biopsia de piel de la zona anterior del brazo tras la obtención del correspondiente consentimiento informado.

Los fibroblastos fueron posteriormente cultivados a partir de los explantes obtenidos.

En todos los casos se realizó el estudio del gen *SOD1* tras la extracción de ADN del cultivo celular, siendo positivo únicamente en el cultivo procedente del paciente II:1 de la familia B.

5 Estudio de la cadena respiratoria mitocondrial

Para evaluar la función mitocondrial, se midieron las actividades de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial, el estado de oxidación del Coenzima Q (transportador móvil de la cadena respiratoria) y la concentración de ATP.

5.1 Actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

En la figura 20 se observa la representación comparada entre pacientes y controles, con las medias de los valores de actividad obtenidos para cada complejo.

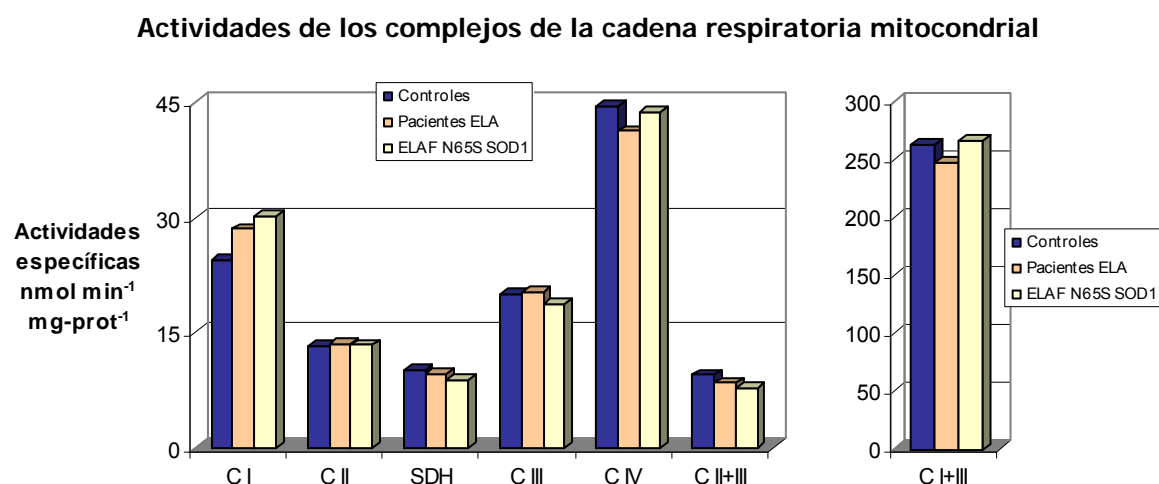


Figura 20: representación de las medias de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, obtenidas en los dos grupos de líneas celulares primarias: pacientes y control; y en ELAF con la mutación N65S SOD1. Las medidas de las actividades de los complejos I+III se han reflejado en otra gráfica debido a la elevada diferencia de escala. Los ensayos se realizaron por duplicado, partiendo de confluencia en los cultivos celulares y siempre entre los pases 5^o y 10^o.

No se encontraron diferencias significativas en las diferentes actividades enzimáticas

5.2 Medida del estado de oxidación del Coenzima Q

Además se realizó el estudio del estado de oxidación del Coenzima Q mediante la técnica de HPLC. En la figura 21 se observan los valores comparados de los pacientes y controles.

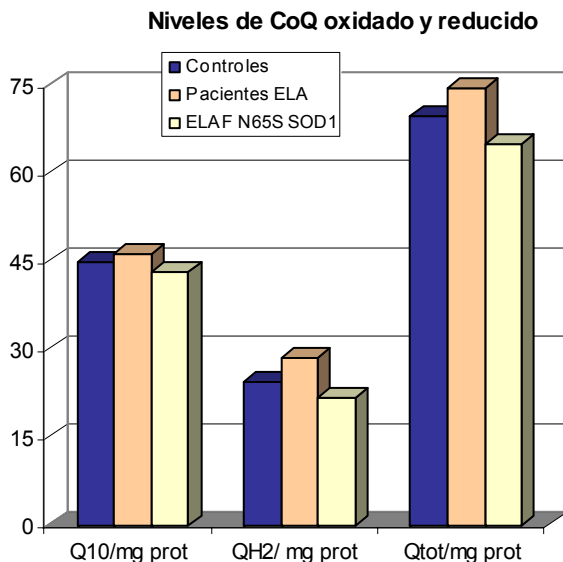


Figura 21: representación de las medias obtenidas para Coenzima Q oxidado y reducido en los dos grupos de líneas celulares primarias: pacientes y control. Los ensayos se realizaron por duplicado, partiendo de confluencia en los cultivos celulares y siempre entre los pases 5^o y 10^o. No se observaron diferencias significativas

5.3 Concentración de ATP

El estado energético se estudió mediante una técnica de bioluminiscencia midiendo la concentración de ATP producido en las diferentes líneas celulares, en la figura 22 se pueden observar los resultados obtenidos expresados como medias y desviaciones estándar de los dos grupos.

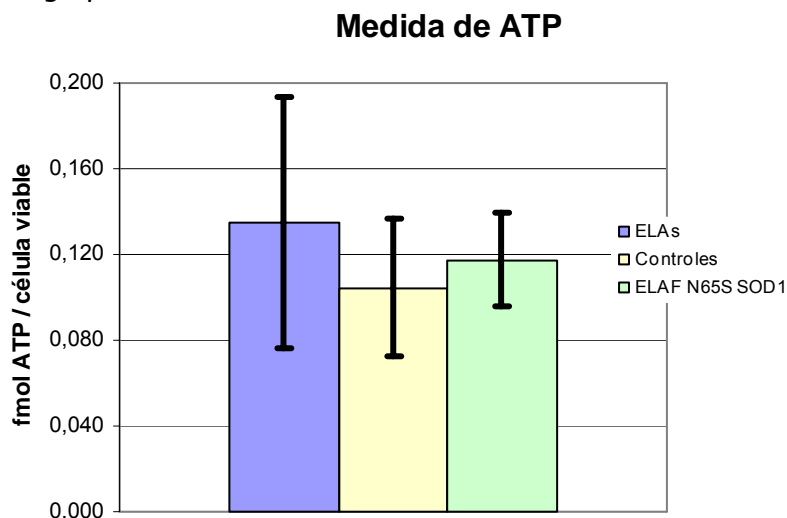


Figura 22: representación de las medias y sus respectivas desviaciones estándar de las concentraciones de ATP en las líneas celulares primarias de los grupos de pacientes y controles. Los ensayos se realizaron por duplicado, partiendo de confluencia en los cultivos celulares y siempre entre los pases 5^o y 10^o. No se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos

6 Estudio de los enzimas destoxicantes de EROs

Dada la relación existente entre la etiopatogenia de la ELA y el estrés oxidativo, evaluamos la actividad de los principales enzimas relacionados con la destoxicación celular de radicales libres de oxígeno en las líneas de fibroblastos que componen la 'Muestra de estudio'.

Estos enzimas actúan conjuntamente en una ruta destoxicante de EROs según se indica en la figura 23.

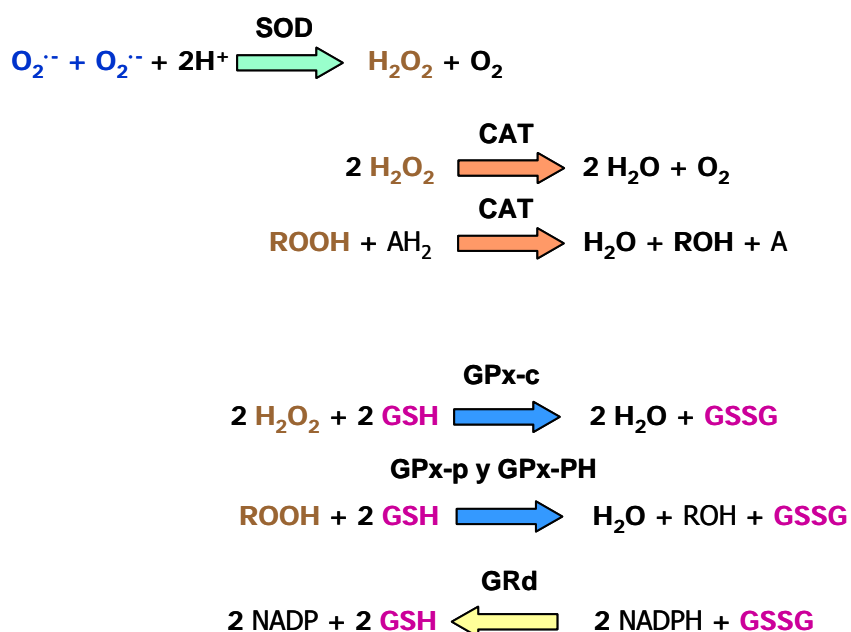


Figura 23: Representación gráfica de las reacciones enzimáticas en que se encuentran implicados los enzimas antioxidantes. Se observan dos sistemas: el SOD / CAT y el GPx / GRd.

SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GPx-c: glutathion peroxidasa citosólica; GPx-p: glutathion peroxidasa plasmática o extracelular; GPX-PH: glutathion fosfolipoperoxidasa; GRd: glutathion reductasa; GSH: glutathion reducido; GSSG: glutathion oxidado

En la figura 24 se aprecian las medias de las actividades de cada enzima en los pacientes y controles. No observamos diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo las actividades catalasa y glutathion peroxidasa del paciente con la mutación N65S en el enzima SOD1 resultó ser 6 y 3 veces mayor con respecto a la media de los controles.

Actividades de los enzimas de eliminación de radicales libres

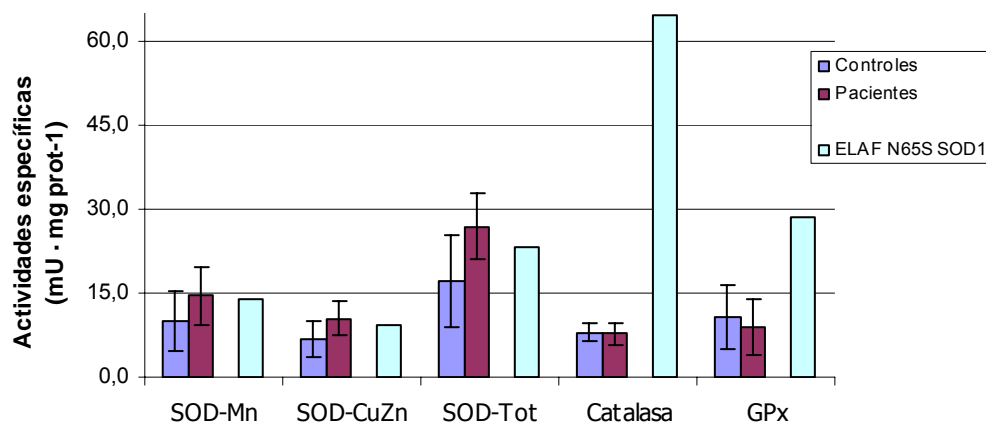


Figura 24: representación de las medias y desviaciones estándar de las actividades enzimáticas de los enzimas antioxidantes (SOD citosólica y mitocondrial, catalasa y glutatión peroxidasa) en las líneas celulares primarias de pacientes y controles. La tercera medida corresponde a los valores de las actividades enzimáticas del paciente con la mutación N65S SOD1. Los ensayos se realizaron por duplicado, partiendo de confluencia en los cultivos celulares y siempre entre los pases 4^o y 10^o.

No se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos entre ambos grupos. En el caso del paciente con la mutación N65S SOD1 se observa un aumento en la actividad de los enzimas catalasa y glutatión peroxidasa.

7 Estudio de la cantidad relativa de EROs, concentración de glutatión y potencial de membrana mitocondrial

Del mismo modo y con el fin de estudiar la implicación del estrés oxidativo, se efectuaron medidas de la cantidad relativa de EROs y glutatión en todas las muestras utilizando técnicas celulares de fluorescencia en un citómetro de flujo.

7.1 EROs

Los valores relativos de la cantidad de EROs fueron similares en los dos grupos (figura 25).

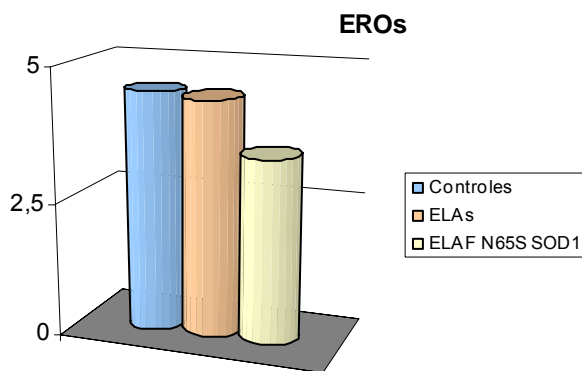


Figura 25: representación de las medias de EROs en las líneas de fibroblastos de pacientes y controles. Los ensayos se realizaron por triplicado, partiendo de semiconfluencia en los cultivos celulares y siempre entre los pases 3^o y 7^o.

No se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos

Para tratar de incrementar la producción de EROs, las células también se cultivaron en medio rico en galactosa con el fin de desviar su producción energética a través de la cte.

En otro experimento adicional y con la finalidad de provocar un aumento del estrés oxidativo, las células se incubaron en medio con peróxido de hidrógeno. Durante 30 y 60 minutos.

Los resultados de las medidas de radicales libres en estas condiciones se observan en la figura 26. No se apreciaron diferencias significativas entre los pacientes y controles.

En el caso del cultivo celular primario obtenido del paciente con la mutación N65S SOD1, las concentraciones relativas de radicales libres fueron significativamente inferiores en presencia de H₂O₂ (figura 26).

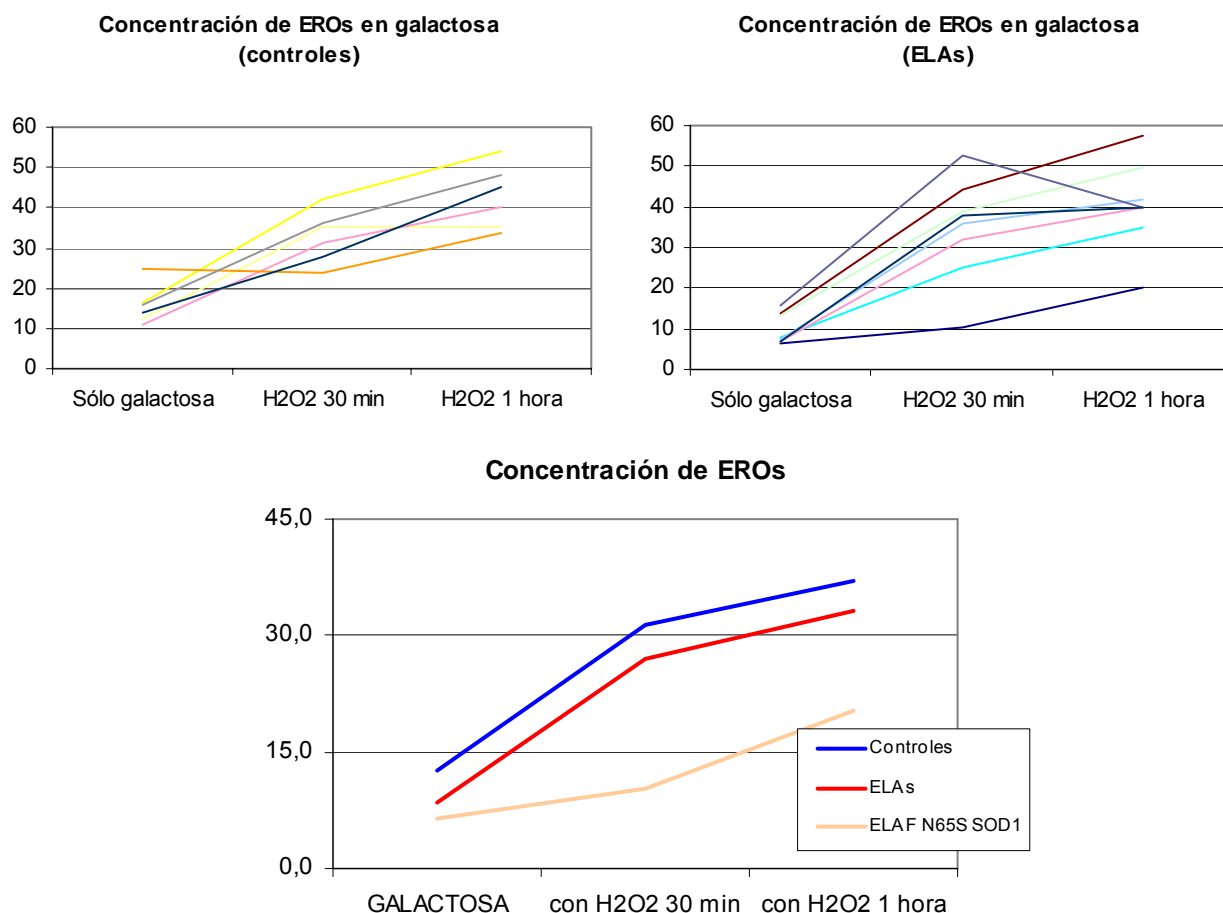


Figura 26: representación de las curvas obtenidas a partir de las medidas relativas de EROs mediante la técnica de citometría de flujo en las líneas celulares primarias de pacientes y controles. Las líneas de fibroblastos fueron cultivadas en medio con galactosa. A su vez, y previo a la medida, se añadió H₂O₂, midiéndose los niveles de EROs tras 30 minutos y una hora de incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado, partiendo de semiconfluencia en los cultivos celulares y siempre entre los pases 3^o y 7^o. No se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos entre controles y pacientes. Solo en el caso del paciente con la mutación N65S SOD1 se observa menor cantidad de EROs en el medio tras la adición de H₂O₂.

7.2 Glutation

La concentración de glutatión y su estado de oxidación también representan una medida relativa de la capacidad celular de detoxificación de EROs. Por ello se midieron los valores de glutatión mediante técnicas de fluorescencia en un citómetro de flujo.

En la figura 27 se pueden observar las medias de glutatión en pacientes y controles. No se encontraron diferencias significativas en medio normal con glucosa, ni en presencia de galactosa en él.

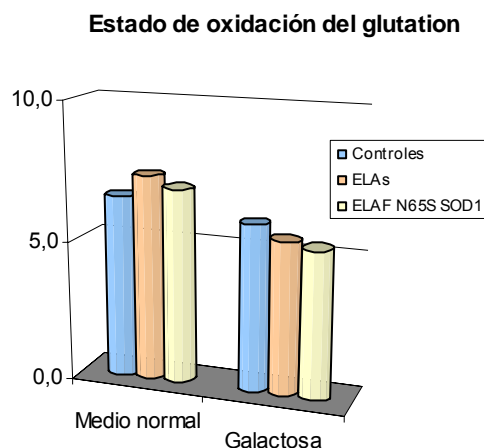


Figura 27: representación de las medias obtenidas a partir de las medidas relativas de glutatión en las líneas de fibroblastos separadas en los dos grupos de pacientes y control. Se realizaron medidas en cultivos en medio con glucosa y con galactosa. Los ensayos se realizaron por triplicado, partiendo de semiconfluencia en los cultivos celulares y siempre entre los pases 3^o y 7^o. No se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos.

7.3 Potencial de membrana mitocondrial

Finalmente y para completar el estudio sobre función mitocondrial se evaluó el potencial de membrana mitocondrial mediante fluorescencia en citometría de flujo.

Potencial de membrana mitocondrial

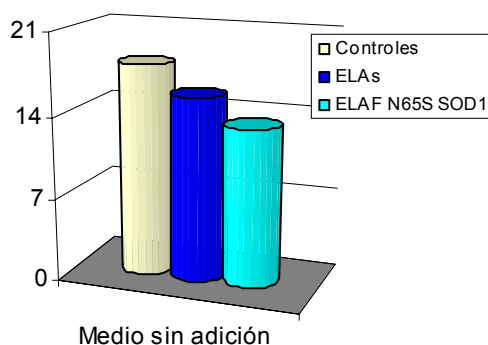


Figura 28: representación de las medias obtenidas a partir de las medidas relativas del potencial de membrana mitocondrial en las líneas de fibroblastos separadas en los dos grupos de pacientes y control. Los ensayos se realizaron por duplicado, partiendo de semiconfluencia en los cultivos celulares y siempre entre los pases 3^o y 7^o. No se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos.

Los resultados de los potenciales de membrana mitocondrial en los pacientes y controles se pueden observar en la figura 28. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos.

También se evaluó el potencial de membrana mitocondrial en medio con galactosa y con adición de H_2O_2 . Las medidas relativas del potencial de membrana mitocondrial de los dos grupos en ambos casos se pueden observar en la figura 29.

No se encontraron diferencias significativas en el potencial de membrana mitocondrial entre los pacientes y controles ni en el caso de crecimiento en galactosa ni con la adición de peróxido de hidrógeno.

Potencial de membrana mitocondrial

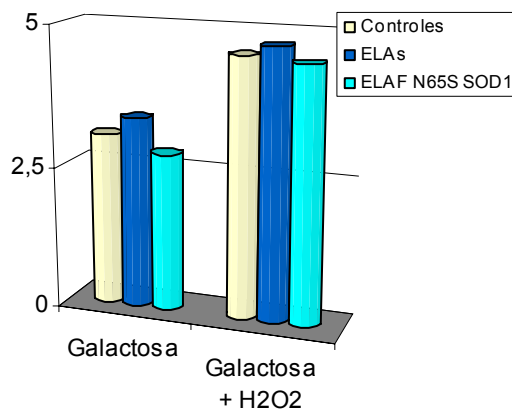


Figura 29: representación del potencial de membrana mitocondrial en las líneas de fibroblastos de pacientes y controles. Estas medidas se realizaron tras cultivar las líneas celulares en galactosa, separando parte del cultivo en el momento previo a la determinación y añadiendo en una alícuota H_2O_2 manteniendo el mismo durante 1 hora. Los ensayos se realizaron por duplicado, partiendo de confluencia en los cultivos celulares y siempre entre los pases 3^o y 7^o.

No se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos

8 Estudio del ADN mitocondrial mediante Southern Blot

Para cumplir con el último objetivo se realizaron mediante la técnica de Southern blot medidas de la cantidad relativa de ADN mitocondrial con respecto al ADN nuclear evaluado mediante el ARN r 18S.

En la figura 30 se observan las medidas de densidad de la carga de ADN mitocondrial y nuclear, de algunos cultivos de fibroblastos utilizados.

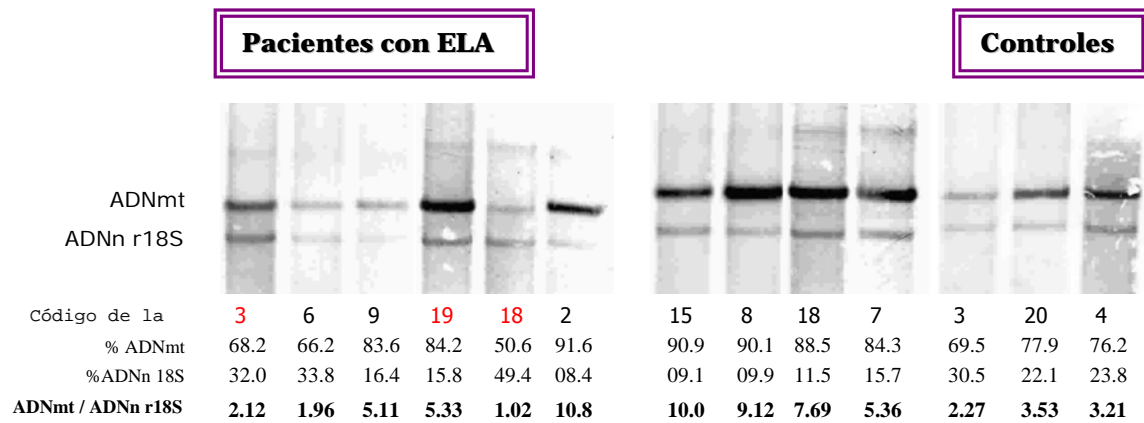


Figura 30: Southern blot de algunos pacientes y controles. Se pueden observar las bandas correspondientes al ADNmt y al ADNn

El número en negrita (inferior) corresponde al cociente entre las cantidades relativas de ambas especies de ADNmt / ADNn r18S

En la figura 31 se pueden ver las medias comparadas de las concentraciones relativas de ADN mt y ADN n en controles y en pacientes. Estas medidas no fueron significativamente diferentes, aunque se puede apreciar un menor índice en el caso del grupo de las ELAs.

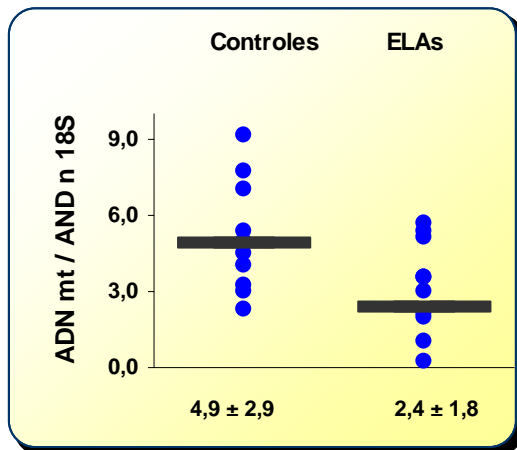


Figura 31: representación de la cantidad de ADNmt / ADNn en pacientes y controles
No se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos

En ninguno de los estudios genéticos realizados mediante southern blot se observaron fragmentos apreciables de ADN mt diferentes en tamaño a la molécula de ADN mt normal. Por lo tanto no se han encontrado deleciones únicas o múltiples en los cultivos de fibroblastos que conforman la 'Muestra de estudio'.

DISCUSIÓN

1 Estudio genético de *SOD1* en pacientes ELAE y ELAF en la población española

1.1 Resultados epidemiológicos

En este trabajo se han detectado 3 mutaciones exónicas en el gen *SOD1*. Dos de ellas representan mutaciones nuevas no documentadas en la literatura.

Inicialmente se realizó una selección de pacientes diagnosticados con ELA, con un exhaustivo estudio de la historia familiar. En esta selección se incluyeron en el cribado molecular un total de 85 pacientes ELAE y 12 familias las que se había diagnosticado al menos dos miembros con ELA.

El análisis molecular mostró la presencia de la mutación G37R *SOD1* en dos de las familias seleccionadas. Tras una revisión de la historia de ambas familias encontramos antecedentes comunes 5 generaciones atrás, por lo que las consideramos una sola familia a efectos de datos epidemiológicos (familia A). Nuestra muestra de ELAF tiene un total de 11 familias.

Dos de las 11 familias estudiadas (18,2%) presentaron mutación, mientras que sólo uno de los 85 casos esporádicos mostró alteraciones en el gen *SOD1*. Un análisis genético detallado de los familiares del paciente con ELAE aparente puso de manifiesto que la mutación encontrada es de penetrancia incompleta y que se trata de un caso de ELAF. Por consiguiente, la frecuencia de mutaciones en ELAF es del 25% (3 de 12 familias estudiadas).

Además, se han encontrado dos polimorfismos (SNPs) no descritos previamente: i) en el exón 2 un polimorfismo silente c84A>G correspondiente a la posición Gly 27 de *SOD1*; y ii) en el intrón 3 un cambio nucleotídico (IVS3+25G>C) cercano al punto de procesamiento del ARNm que podría interferir en la expresión de *SOD1*.

En familias con ELAF y en algunos pacientes con ELAE de diferentes grupos étnicos se han descrito un número creciente de mutaciones *SOD1*, entre las que se incluyen mutaciones puntuales de cambio aminoacídico (missense) y mutaciones sin sentido (nonsense) de término de la transcripción, así como microrreorganizamientos, estableciendo de este modo la heterogeneidad genética de esta enfermedad ¹⁵⁰.

En estos estudios previos realizados en diferentes países y grupos étnicos, la frecuencia de las mutaciones *SOD1* en pacientes ELAF es del 23,5% en Escandinavia ⁴⁰, 23,4% en los EE.UU. ³⁶, 21% en Gran Bretaña ¹⁵¹ y 14,3% en Francia ¹⁵². En el caso de

pacientes con ELA aparentemente esporádica (ELAE) la frecuencia encontrada de mutaciones es mucho menor, siendo del 7% en Escocia ¹⁵³, 4% en Escandinavia ⁴⁰ y 3% en Inglaterra ¹³⁷.

Nuestros resultados son similares a los documentados en otros estudios ya que sólo alrededor de la cuarta parte de nuestras familias ELAF presentaron mutaciones en *SOD1* y las alteraciones en dicho gen se encontraron en el 1,2% de los pacientes ELAE estudiados por nuestro grupo.

Dado que los casos ELAF suponen entre el 5% y el 10% del total de pacientes con ELA, las mutaciones *SOD1* explican tan sólo el 1,1% al 1,9% de los casos de ELA (ELAF – *SOD1*). Comparativamente, los casos ELAE suponen el 90% restante y las alteraciones en *SOD1* justifican el 1,2% - 6,5% de los casos de ELA (ELAE – *SOD1*). La etiopatogenia de la enfermedad es muy heterogénea, si bien es notable el hecho de que hasta el momento ninguna otra enfermedad diferente a la ELA se haya asociado con alteraciones en *SOD1*.

Estos datos confirman la susceptibilidad genética frente a *SOD1* de los pacientes que sufren ELA con independencia de su historia familiar, indicando que el análisis molecular del gen *SOD1* se debería realizar en todos pacientes que cumplan los criterios diagnósticos de la enfermedad.

1.2 Mutaciones encontradas y patogenicidad

Las diferentes mutaciones *SOD1* causan enfermedades de la motoneurona que difieren respecto a la penetrancia (habitualmente del 100%, pero en algunas ocasiones inferior), edad de inicio (generalmente tras la edad de 40 pero algunas veces más temprano), supervivencia (en intervalos de 1 a 20 años), y manifestaciones clínicas (los síntomas iniciales pueden ser bulbares ó espinales)¹⁵⁴.

Además, mutaciones heterocigotas del gen *SOD1* se han identificado en un pequeño número de pacientes con ELA esporádica. Los familiares portadores de la mutación de algunos de estos pacientes puede que representen una penetrancia incompleta de la enfermedad. En este sentido, en el presente estudio se identificó un paciente con ELAE aparente y mutación en *SOD1*, que tras el análisis molecular en miembros de su familia se reclasificó como ELAF asociada a una mutación *SOD1* con penetrancia incompleta.

Los tres defectos moleculares identificados en las familias españolas resultaron ser mutaciones (missense) de cambio aminoacídico: una substitución G37R en el exón 2 publicada previamente en una familia americana ¹⁵⁵, una substitución N65S en el exón 3,

y una sustitución I112M en el exón 4. Las siguientes evidencias sugieren que cada una de estas tres mutaciones podría ser la causa de la enfermedad: i) causan sustituciones de aminoácidos muy conservados en la estructura primaria de SOD1; ii) son las únicas alteraciones nucleotídicas encontradas en la región codificante y en las regiones cercanas a los puntos de procesamiento del ARNm del gen *SOD1*; y iii) no fueron detectadas en 100 sujetos control del mismo origen étnico.

1.2.1 G37R SOD1

La mutación G37R fue descrita en una de las 23 familias analizadas en el primer estudio que relacionó la ELA con mutaciones en el gen *SOD1*³⁴.

El cambio de glicina por arginina origina una variación significativa en la polaridad de la proteína.

La estructura primaria de la proteína contiene 25 residuos de glicina, que constituyen casi 1/6 del total de aminoácidos y se distribuyen uniformemente a lo largo de la secuencia¹⁵⁶. Esto hace que la hoja β sea una característica prominente de la estructura secundaria de esta enzima. Todo ello lleva a pensar que esta mutación tendría una relación directa con la estructura terciaria de la proteína.

Esta mutación se encuentra en el exón 2 del gen *SOD1* en una región de alta probabilidad de mutaciones (se han descrito 8 diferentes) implicada en la unión al Cu a través de los residuos de histidina H46 y H48.

La familia A, con la mutación G37R, muestra un inicio temprano de la enfermedad, larga supervivencia y penetrancia completa (prácticamente del 100%). El fenotipo clínico es muy similar al de la única familia publicada con la misma mutación (de los EE.UU.)^{34,36}, con un inicio de síntomas espinal, en miembros inferiores.

La observación de que otra familia con ELA de diferentes orígenes étnicos es portadora de la mutación G37R confirma su patogenicidad. Además, ambas familias muestran una progresión muy lenta de la enfermedad (20 años de supervivencia media).

1.2.2 N65S SOD1

La sustitución N65S causa un cambio marcado en la polaridad de la proteína, que podría alterar la función del enzima debido a la cercanía de este aminoácido a la histidina 63, que está implicada en las uniones entre los dos homopolímeros de la proteína y en la estructura del lugar de acoplamiento para el Zn y el Cu¹⁵⁷. El residuo de asparragina en la

posición 65 está fuertemente conservado en la escala evolutiva como se puede comprobar en la figura 18.

Es importante señalar que varias de las mutaciones encontradas en esta región se han asociado a pacientes con ELA esporádica, lo que implica que las mutaciones *SOD1* en el exón 3 pueden ser de baja penetrancia.

La paciente con la sustitución N65S no tenía historia familiar de enfermedad de neurona motora, y se describió como de naturaleza esporádica de lenta progresión. Sin embargo, el análisis molecular de sus hermanos y hermana mostró que dos de ellos portaban la mutación sin expresión clínica, sugiriendo que nuestro paciente podría tener ELAF de baja penetrancia. Aunque se han publicado mutaciones en el gen *SOD1* en una baja proporción de pacientes ELAE, nuestros datos confirman que únicamente un estudio genético familiar exhaustivo puede distinguir realmente los casos esporádicos de los aparentemente esporádicos³⁸.

La enfermedad se inició a los 44 años de edad, con una supervivencia actual de 18 años. El cuadro clínico se inició con síntomas espinales y ausencia de alteraciones bulbares en los exámenes posteriores.

Recientemente se ha descrito otro paciente varón con la misma mutación de origen sudafricano y raza blanca. El inicio de los síntomas se produjo a los 45 años, con una supervivencia de 14 años¹⁵⁰, y síntomas espinales al comienzo con ausencia actual de síntomas bulbares y torácicos. El paciente tiene un hermano y una hermana en la quinta década de la vida, y el hermano padece esquizofrenia. Existe cierta relación con la abuela paterna que fue diagnosticada inicialmente de atrofia muscular con fatiga y problemas de deglución. Esta mujer utilizó un andador a partir de los 52 años y una silla de ruedas desde los 60. Llegó a desarrollar síntomas bulbares severos y falleció a la edad de 62 años. Sus padres y hermanos no desarrollaron enfermedad neurodegenerativa alguna y murieron de causas no relacionadas con enfermedad de motoneurona. Curiosamente parece que los familiares de este paciente emigraron a los EE.UU. durante la Primera Guerra Mundial desde Rodesia, a donde habían migrado desde España en el siglo XV.

1.2.3 I112M SOD1

La mutación I112M reemplaza un aminoácido hidrofóbico, la isoleucina, con una metionina que contiene azufre. La isoleucina 112 de *SOD1* se encuentra estrictamente conservada entre especies (figura 19) y por tanto es esperable que tenga efectos deletéreos en la estructura y función de *SOD1*.

En la región del enzima en donde se localiza esta mutación, correspondiente con el exón 4º del gen, es donde se encuentra la más alta concentración de mutaciones, la mayoría de ellas descritas como modificadoras de la estructura terciaria del enzima e incluso responsables de la formación del homodímero.

Es notable que esta mutación de lugar a fenotipos variables (inicio bulbar o espinal de la enfermedad) entre diferentes miembros de la familia; este hecho se ha documentado previamente en otras familias con mutaciones *SOD1*, en que aparecen individuos con diferente grupo muscular inicial afectado, diferente edad de comienzo, diferente supervivencia y con una penetrancia próxima al 100%.

Cabe destacar que una mutación en la misma posición, I112T¹⁵⁵, había sido descrita en otras familias cuyos hallazgos clínicos son muy similares a los de la familia con la mutación I112M (50 años de media edad de comienzo en un intervalo desde la 4ª a la 7ª década de la vida), variabilidad intrafamiliar en aparición de síntomas y supervivencia.

2 Estudios bioquímicos y celulares en fibroblastos de pacientes ELAE y ELAF

Durante la última década se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo*, especialmente con animales transgénicos y líneas celulares, encaminados a demostrar diferentes hipótesis etiopatogénicas, centrados en la excitotoxicidad y el estrés oxidativo en particular tras la relación entre ELA y mutaciones en *SOD1*.

Los tejidos en donde se han centrado las investigaciones han sido el córtex motor y la médula espinal dentro del SNC, y el músculo. Además en varias publicaciones se describen trabajos desarrollados en otras regiones del SNC (como el cerebelo), linfocitos, sangre total, hígado y fibroblastos.

La elección de fibroblastos de los enfermos con ELA como tejido para desarrollar el presente estudio se produjo por dos razones: i) accesibilidad y facilidad de obtención de muestra sin recurrir a métodos invasivos en pacientes con mucha carga 'psicológica' por la enfermedad *per se* ; ii) presencia del enzima *SOD1* en dicho tejido, lo que podría consolidarlo como modelo celular de la enfermedad: de esta manera se podría evaluar la función mitocondrial y el estatus de formación y detoxificación de EROs.

2.1 Evaluación de la función mitocondrial

Estudios previos realizados en músculo esquelético y tejido nervioso han mostrado alteraciones en algunos complejos enzimáticos de la cte en pacientes con mutaciones SOD1.

En el presente trabajo realizado en fibroblastos de pacientes con ELA no se han encontrado alteraciones en la cte, concentración de ATP o en la de coenzima Q. Este es el primer estudio documentado sobre enzimas de la cadena respiratoria en fibroblastos de pacientes con ELA.

Estos datos a diferencia de los previamente obtenidos en tejido postmortem de SNC (en donde se había encontrado aumento de las actividades de los complejos I y II+III) y en músculo (con incremento de la actividad del complejo IV) llevarían a pensar que las variaciones en las actividades de los complejos de la cte halladas en otros tejidos podrían tener su origen en la degeneración de neuronas motoras y/o la denervación que tiene lugar en músculo esquelético.

Por otro lado investigaciones en híbridos transmitocondriales ¹²² (híbridos citoplásmicos) obtenidos a partir de mitocondrias de plaquetas de pacientes con ELA y una línea de neuroblastoma han mostrado defectos del complejo I de la cte y aumento en la actividad de los enzimas antioxidantes, SOD2, GPx, GRd y catalasa.

La demostrada afectación mitocondrial encontrada en tejido diana y en líneas derivadas del mismo sugiere que este efecto, probablemente secundario a las causas etiopatogénicas de la enfermedad, podría ser tejido-específico.

2.2 Evaluación del estatus de formación y detoxificación de EROs

2.2.1 Aspectos generales

La medida de las actividades de los enzimas responsables de la eliminación de radicales libres y del equilibrio redox celular ha sido uno de los puntos clave en el estudio de la etiopatogenia de la ELA desde el descubrimiento de la relación entre las mutaciones en el gen *SOD1* y la enfermedad.

En el presente trabajo se realizaron medidas de las actividades de los enzimas SOD1 y SOD2, catalasa y GPx en cultivos de fibroblastos. Las actividades de dichas enzimas fueron similares en pacientes y en controles (figura 26), lo que plantea que el sistema de detoxificación de EROs puede no encontrarse afectado en pacientes con ELAE o ELAF sin mutaciones SOD1 ⁹⁷.

Existen datos en la literatura que demuestran el aumento de la proteína SOD2 en fibroblastos de 3/10 pacientes ELAE ¹³¹. Los autores sugieren que existe un subgrupo de ELAE en el que se daría este hecho asociado con una disminución de Bcl-2 e inducción de apoptosis. En nuestro caso no se ha encontrado un subgrupo de pacientes con aumento de la actividad SOD2.

Los resultados observados en los enzimas detoxificantes son consistentes con los obtenidos en las cantidades de EROs y glutation, que son marcadores del equilibrio redox celular. La producción de EROs y la concentración de glutation fueron similares en pacientes y en controles (figuras 25 y 27).

En un estudio adicional en fibroblastos crecidos con galactosa tampoco se observaron diferencias en la producción de EROs entre pacientes y controles (26). Este hecho es especialmente relevante si se tiene en cuenta que la obtención de energía en los fibroblastos cultivados con galactosa se produce mayoritariamente a través del ciclo de Krebs y la cte.

Para inducir en mayor medida la producción de EROs en el medio con galactosa se añadió H₂O₂, midiendo la concentración de dichas especies a los 30 y 60 minutos. De nuevo no observamos diferencias entre el comportamiento de las células de los pacientes y de los controles.

Todos estos datos en conjunto llevan a pensar que los fibroblastos de pacientes con ELA sin mutaciones SOD1 no muestran alteraciones en la función mitocondrial ni en la producción o detoxificación de EROs.

2.2.2 Resultados en ELAF asociada con mutaciones SOD1

El paciente con la mutación N65S SOD1 mostró actividades SOD1 y SOD2 (SOD mitocondrial), dentro del rango del grupo control. En otros estudios realizados en diferentes tejidos de pacientes con mutaciones SOD1 se han encontrado datos muy variables de actividades enzimáticas ⁶²⁻⁶⁸.

Sin embargo, las actividades de los enzimas catalasa y glutation peroxidasa, se incrementaron notablemente con respecto a los controles. Además se observó que la producción de EROs tras 30 y 60 minutos de adición de peróxido de hidrógeno fue menor que en el resto de cultivos de fibroblastos (pacientes y controles). Este resultado es consistente con el obtenido en las actividades de los enzimas antioxidantes pues tanto la actividad catalasa como la GPx se encargarían de eliminar el H₂O₂ del medio, evitando su efecto productor de radicales libres.

La catalasa es uno de los enzimas conocidos más eficientes, tanto que no puede ser saturado por H_2O_2 a ninguna concentración, catalizando su conversión en H_2O y O_2 . Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. Este enzima se encuentra en los peroxisomas y se ha descrito en ratones transgénicos con la mutación SOD1 G93A que los peroxisomas se adhieren a la membrana mitocondrial y se internalizan en las vacuolas resultantes de la expansión del espacio intermembrana mitocondrial y de la extensión de la membrana mitocondrial externa¹⁵⁸. La razón de este posible efecto quimiotáctico no está del todo clara, pero está relacionado con la presencia de agregados del enzima SOD1 mutante.

Además del sistema SOD/CAT el otro sistema antioxidante celular es el formado por GPx/GRd (glutathion peroxidasa y glutathion reductasa). Ambos sistemas no actúan a la par, la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y la GPx lo hace a concentraciones bajas, lo que implica una relación inversa en la regulación de ambas enzimas. Este hecho nos hace pensar que el efecto encontrado en la línea de fibroblastos procedente del mutante N65S no está relacionado con la regulación de los genes CAT y GPx, sino con un efecto tóxico producido por el enzima SOD1 mutante. Además este efecto tóxico estaría relacionado con la presencia de H_2O_2 en la célula.

Existen datos en la literatura que apoyan la adquisición de una ganancia de función tóxica por parte del enzima mutante SOD1. Se ha encontrado que varias mutaciones producen SOD1 deficientes en Zn^{2+} ^{84,85}. La mutación N65S se encuentra próxima al residuo H63 que es el único aminoácido responsable de la unión simultánea a Zn^{2+} y Cu^{2+} . Los mutantes deficientes en Zn^{2+} podrían sufrir una rápida reducción $Cu^{2+} > Cu^{1+}$ por la acción de reductores intracelulares⁵⁸, lo que daría lugar a un aumento de la reacción SOD1 reversa con predominio de actividad superóxido reductasa y elevación de la producción de H_2O_2 . Además esto podría dar lugar a mayor interacción entre NO y EROs con incremento de nitrotirosinación de proteínas, hallazgo encontrado en varios tipos de tejidos en pacientes con ELA⁷⁹⁻⁸¹.

2.3 Estudio del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) es un indicador del estado energético y de la homeostasis del Ca intramitocondrial.

En la literatura se han encontrado disminuciones del Ψ_m y elevación en la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial en cultivos celulares de tejido nervioso y en críbridos transmitocondriales.

En nuestro trabajo y en consonancia con los resultados previamente obtenidos en las medidas de las actividades de los complejos de la cte, los valores de Ψ_m en pacientes y en controles resultaron similares.

Al igual que en los experimentos de EROs, y con el fin de provocar un incremento del estrés oxidativo celular, se efectuaron medidas del Ψ_m en medio con galactosa (activador de la función OXPHOS) y con adición de H_2O_2 . El Ψ_m no varió significativamente entre pacientes y controles.

Nuestros datos una vez más sugieren que no se produce alteración oxidativa en tejidos no afectados en la ELA.

2.4 Estudios del ADN mitocondrial

En varios estudios se ha relacionado la degeneración motoneuronal en la ELA con mutaciones en el ADNmt. Se han encontrado en músculo esquelético delecciones múltiples y/o depleción de ADNmt en pacientes con ELA y en corteza motora la delección común relacionada con múltiples enfermedades mitocondriales.

En nuestro trabajo se realizó el estudio de ADNmt en todos los cultivos buscando la presencia de alteraciones cualitativas o cuantitativas.

Nuestros datos no lograron detectar alteraciones si bien las concentraciones de ADNmt resultaron ser algo menores en el grupo de pacientes.

Estos resultados son de nuevo consistentes con los obtenidos previamente en las actividades de los complejos de la cte, las actividades de los enzimas antioxidantes y el potencial de membrana mitocondrial.

La conclusión general de los estudios en líneas primarias de fibroblastos de pacientes con ELA es que no se ve afectada la función mitocondrial.

3 Consideraciones finales

En varios de los estudios, concretamente en el de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, las actividades de los enzimas antioxidantes y en la medida de la cantidad de ADNmt, la variabilidad de los resultados ha sido muy alta.

Como ya se ha descrito previamente, el ADN mitocondrial tiene un rango de mutación diez veces más grande que el ADN nuclear y además no posee mecanismos de reparación eficientes. Esto implica que posee mayor rango de variabilidad en la experimentación inter día con cultivos en el laboratorio. Para evitar este hecho, se analizaron estudios previos de mutaciones de ADNmt en cultivos medida de las actividades enzimáticas de los complejos de la cte. En ellos se consideran estables las células primarias durante los 15 primeros pases y las células transfectadas hasta el pase 18-22. Por esta razón realizamos nuestros experimentos entre el 3º y el 7º pase de las células, contabilizando como pase uno el desarrollo de los fibroblastos partiendo de los explantes obtenidos en la biopsia de piel.

Además el estado del cultivo fue siempre el mismo, realizando los estudios cuando se había alcanzado una confluencia del 100% y el estado energético de las células no se veía afectado por la división sino por el mantenimiento de sus funciones vitales.

Teniendo en cuenta las consideraciones previas, la elevada desviación estándar en los resultados obtenidos en nuestro trabajo es similar a la observada en estudios bioquímicos en cultivos primarios, variabilidad que en muchas ocasiones interfiere en la búsqueda de diferencias entre las actividades enzimáticas.

La conclusión es que los fibroblastos no son el medio adecuado para estudiar la función mitocondrial en pacientes con ELA, por no ser el tejido diana de su expresión clínica.

Hasta la fecha, no existe ninguna terapia farmacológica curativa para la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Tan sólo hay un medicamento, aprobado por las diferentes agencias nacionales e internacionales, para el tratamiento de la ELA llamado riluzole (Rilutek®), que produce un aumento de la esperanza de vida de los pacientes (en aproximadamente 4 a 6 meses) demostrado en varios ensayos clínicos. Se trata de una molécula que induce la recaptación de glutamato en los terminales sinápticos y reduce la concentración de este neurotransmisor evitando sus demostrados efectos excitotóxicos en situaciones de liberación continuada y/o altas concentraciones.

Desafortunadamente los pacientes tratados con este compuesto no experimentan enlentecimiento de su pérdida de fuerza a lo largo del tiempo o mejoría al menos temporal en la función muscular. Esto se debe al pequeño beneficio de esta molécula y al efecto psicológico de la patología pues individualmente los pacientes no han vivido la enfermedad previamente y no conocen cómo iba a progresar su debilidad muscular sin el efecto del fármaco.

A pesar de su eficacia limitada, los resultados con riluzole apoyan la toxicidad del glutamato en el desarrollo de la muerte celular en la ELA.

Se han probado diferentes tipos de moléculas como son los factores neurotróficos y derivados de los mismos, antiinflamatorios e inmunomoduladores, reguladores de la síntesis o ensamblaje de neurofilamentos, moléculas antiapoptóticas, factores antiglutamato (como el riluzole), antioxidantes y moléculas que influyen en el metabolismo energético (creatina y coenzima Q₁₀). Todos estos compuestos han demostrado una eficacia sobre la patología en modelos animales de la enfermedad (el ratón G93A SOD1 es el más utilizado), lo cual implica directamente todos estos efectos metabólicos en la etiopatogenia de la ELA.

En nuestro estudio hemos vuelto a demostrar que el estrés oxidativo está relacionado con el proceso patológico de la ELAF asociado a mutaciones en *SOD1*. Estos resultados sugieren el desarrollo de estudios clínicos que eviten el efecto producido por disfunción de la SOD1 que provoca la adquisición de una función tóxica.

Debido a la variabilidad de caminos patogénicos en la ELA el tratamiento de la enfermedad deberá dirigirse en el futuro por dos vías: una en la que se prueben varias terapias en conjunto que inhiban simultáneamente las disfunciones metabólicas; y otra en la que se desarrollen diagnósticos específicos (moleculares, anatómicos, etc.) de grupos de pacientes con una etiopatogenia más específica (como es el caso de aquellos que poseen mutaciones en *SOD1*) para incluirlos en diferentes ensayos con fármacos.

En nuestro estudio se ha demostrado que el diagnóstico molecular SOD1 de los pacientes tanto ELAF como ELAE es muy importante para el estudio familiar y para realizar consejo genético. Pero es importante además tener en cuenta el hecho de que este tipo de pacientes y/o familias en un futuro próximo podrán tener acceso a terapias específicas de su defecto molecular (tanto en cuanto a terapia farmacológica como génica o celular).

CONCLUSIONES

1. Se han encontrado mutaciones en el gen *SOD1* en el 18,2 % de los pacientes con ELAF y en el 1,2% de los pacientes con ELAE.
2. Los pacientes ELAF y ELAE son más propensos que el resto de la población a portar mutaciones en el gen *SOD1*. Se recomienda el diagnóstico genético para todos los individuos diagnosticados de ELA. Sólo un estudio genético familiar exhaustivo puede distinguir los pacientes ELAE de los ELAF de muy baja penetrancia.
3. Las mutaciones G37R, N65S e I112M en la proteína SOD1 están relacionadas con la patología de la ELAF pues cumplen con los criterios de patogenicidad establecidos.
4. Las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, el estado de oxidación del coenzima Q, la producción de ATP y las actividades de los enzimas SOD1, SOD2, catalasa y glutatión peroxidasa en fibroblastos de pacientes con ELA son similares a los de los controles.
5. En cultivos en medio con glucosa, con galactosa y con adición de peróxido de hidrógeno no se observaron diferencias significativas en la concentración de EROs, glutatión y en el potencial de membrana mitocondrial en fibroblastos de pacientes con ELA frente a controles.
6. Las actividades de los enzimas catalasa y glutatión peroxidasa es superior en los fibroblastos del paciente que porta la mutación N65S SOD1 que en el grupo de controles. En el mismo paciente la concentración de EROs es inferior en medio con galactosa y con adición de peróxido de hidrógeno que en el grupo de controles. Este hecho sugiere la ganancia de una función en el enzima mutante N65S SOD1 en relación con el enzima normal.
7. No hay presencia de reorganizamientos ni depleción en el ADNmt de fibroblastos de pacientes con ELA frente a controles.
8. Los fibroblastos no son el medio adecuado para estudiar la afectación de la función mitocondrial en pacientes con ELA, que parece específica del tejido diana que se afecta en esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Charcot, J. De la sclerose laterale amyotrophique. *Prog Med* **2**, 325-327, 341-342, 453-455 (1874).
2. Charcot, J. & Joffroy, A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux anterolateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Norm Pathol* **2**, 354-744 (1969).
3. Strong, M. & Rosenfeld, J. Amyotrophic lateral sclerosis: a review of current concepts. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **4**, 136-43 (2003).
4. Brooks, B. R. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* **124 Suppl**, 96-107 (1994).
5. Ross, M. A. et al. Toward earlier diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: revised criteria. rhCNTF ALS Study Group. *Neurology* **50**, 768-72 (1998).
6. World-Federation-of-Neurology. in *World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* (Airlie House, Warrington, Virginia, 1998).
7. Kleopa, K. A., Sherman, M., Neal, B., Romano, G. J. & Heiman-Patterson, T. Bipap improves survival and rate of pulmonary function decline in patients with ALS. *J Neurol Sci* **164**, 82-8 (1999).
8. Mazzini, L. et al. Percutaneous endoscopic gastrostomy and enteral nutrition in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* **242**, 695-8 (1995).
9. Chou, S. M. Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis: new perspectives on an old disease. *J Formos Med Assoc* **96**, 488-98 (1997).
10. Strong, M. J. et al. A prospective study of cognitive impairment in ALS. *Neurology* **53**, 1665-70 (1999).
11. Massman, P. J. et al. Prevalence and correlates of neuropsychological deficits in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **61**, 450-5 (1996).
12. Wilson, C. M., Grace, G. M., Munoz, D. G., He, B. P. & Strong, M. J. Cognitive impairment in sporadic ALS: a pathologic continuum underlying a multisystem disorder. *Neurology* **57**, 651-7 (2001).
13. Hudson, A. J., Davenport, A. & Hader, W. J. The incidence of amyotrophic lateral sclerosis in southwestern Ontario, Canada. *Neurology* **36**, 1524-8 (1986).
14. Riggs, J. E. Longitudinal Gompertzian analysis of amyotrophic lateral sclerosis mortality in the U.S., 1977-1986: evidence for an inherently susceptible population subset. *Mech Ageing Dev* **55**, 207-20 (1990).
15. Smith, R. G. & Appel, S. H. Molecular approaches to amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Med* **46**, 133-45 (1995).
16. Hand, C. K. & Rouleau, G. A. Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **25**, 135-59 (2002).
17. Lilienfeld, A. M., Jacobs, M. & Willis, M. A study of the reproducibility of muscle testing and certain other aspects of muscle scoring. *Phys Ther Rev* **34**, 279-89 (1954).
18. Durrleman, S. & Alperovitch, A. Increasing trend of ALS in France and elsewhere: are the changes real? *Neurology* **39**, 768-73 (1989).
19. Provinciali, L. & Giovagnoli, A. R. Antecedent events in amyotrophic lateral sclerosis: do they influence clinical onset and progression? *Neuroepidemiology* **9**, 255-62 (1990).

20. Garruto, R. M. Pacific paradigms of environmentally-induced neurological disorders: clinical, epidemiological and molecular perspectives. *Neurotoxicology* **12**, 347-77 (1991).
21. Garruto, R. M., Yanagihara, R. & Gajdusek, D. C. Disappearance of high-incidence amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Neurology* **35**, 193-8 (1985).
22. Plato, C. C., Garruto, R. M., Fox, K. M. & Gajdusek, D. C. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam: a 25-year prospective case-control study. *Am J Epidemiol* **124**, 643-56 (1986).
23. Jablecki, C. K., Berry, C. & Leach, J. Survival prediction in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **12**, 833-41 (1989).
24. Eisen, A., Schulzer, M., MacNeil, M., Pant, B. & Mak, E. Duration of amyotrophic lateral sclerosis is age dependent. *Muscle Nerve* **16**, 27-32 (1993).
25. Strong, M. J., Hudson, A. J. & Alvord, W. G. Familial amyotrophic lateral sclerosis, 1850-1989: a statistical analysis of the world literature. *Can J Neurol Sci* **18**, 45-58 (1991).
26. Cashman, N., Cudkiwicz, M. & Davidson, M. Database APC. Gender effects on duration and onset age of amyotrophic lateral sclerosis. *ALS and other motor neuron disorders* **2**, 41-42 (2001).
27. Hudson, A. J. et al. Clinicopathological features of primary lateral sclerosis are different from amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* **30**, 359-64 (1993).
28. Pringle, C. E. et al. Primary lateral sclerosis. Clinical features, neuropathology and diagnostic criteria. *Brain* **115** (Pt 2), 495-520 (1992).
29. Chen, Y. Z. et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* **74**, 1128-35 (2004).
30. Nishimura, A. L. et al. A novel locus for late onset amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease variant at 20q13. *J Med Genet* **41**, 315-20 (2004).
31. Figlewicz, D. A. & Orrell, R. W. The genetics of motor neuron diseases. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **4**, 225-31 (2003).
32. Siddique, T. et al. Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N Engl J Med* **324**, 1381-4 (1991).
33. Figlewicz, D. A. et al. Identification of flanking markers for the familial amyotrophic lateral sclerosis gene ALS1 on chromosome 21. *J Neurol Sci* **124** Suppl, 90-5 (1994).
34. Rosen, D. R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62 (1993).
35. Orrell, R. W. et al. Clinical and functional investigation of 10 missense mutations and a novel frameshift insertion mutation of the gene for copper-zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **48**, 746-51 (1997).
36. Cudkowicz, M. E. et al. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **41**, 210-21 (1997).
37. Andersen, P. M. et al. Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain* **119** (Pt 4), 1153-72 (1996).
38. Orrell, R. W., Habgood, J., Rudge, P., Lane, R. J. & de Belleruche, J. S. Difficulties in distinguishing sporadic from familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **39**, 810-2 (1996).

39. Orrell, R. W. et al. Clinical characteristics of SOD1 gene mutations in UK families with ALS. *J Neurol Sci* **169**, 56-60 (1999).
40. Andersen, P. M. et al. Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain* **120** (Pt 10), 1723-37 (1997).
41. Ince, P. G., Tomkins, J., Slade, J. Y., Thatcher, N. M. & Shaw, P. J. Amyotrophic lateral sclerosis associated with genetic abnormalities in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase: molecular pathology of five new cases, and comparison with previous reports and 73 sporadic cases of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 895-904 (1998).
42. Hosler, B. A. et al. Refined mapping and characterization of the recessive familial amyotrophic lateral sclerosis locus (ALS2) on chromosome 2q33. *Neurogenetics* **2**, 34-42 (1998).
43. Hadano, S. et al. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* **29**, 166-73 (2001).
44. Yang, Y. et al. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* **29**, 160-5 (2001).
45. Parboosingh, J. S. et al. Absence of mutations in the Mn superoxide dismutase or catalase genes in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord* **5**, 7-10 (1995).
46. Cleveland, D. W. From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron* **24**, 515-20 (1999).
47. Figlewicz, D. A. et al. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* **3**, 1757-61 (1994).
48. Al-Chalabi, A. et al. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* **8**, 157-64 (1999).
49. Price, D. L. et al. Amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer disease. Lessons from model systems. *Rev Neurol (Paris)* **153**, 484-95 (1997).
50. Beaulieu, J.-M., Nguyen, M. D. & Julien, J.-P. Late Onset Death of Motor Neurons in Mice Overexpressing Wild-Type Peripherin. *J. Cell Biol.* **147**, 531-544 (1999).
51. Lin, C. L. et al. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **20**, 589-602 (1998).
52. Nagai, M., Abe, K., Okamoto, K. & Itoyama, Y. Identification of alternative splicing forms of GLT-1 mRNA in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurosci Lett* **244**, 165-8 (1998).
53. Meyer, T. et al. The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. *J Neurol Sci* **170**, 45-50 (1999).
54. al-Chalabi, A. et al. Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with bulbar-onset motor neuron disease. *Lancet* **347**, 159-60 (1996).
55. Comi, G. P. et al. Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol* **43**, 110-6 (1998).
56. Fullerton, H. J. et al. Copper/zinc superoxide dismutase transgenic brain accumulates hydrogen peroxide after perinatal hypoxia ischemia. *Ann Neurol* **44**, 357-64 (1998).
57. Brown, R. H., Jr. Amyotrophic lateral sclerosis. Insights from genetics. *Arch Neurol* **54**, 1246-50 (1997).

58. Siddique, T. & Deng, H. X. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* **5 Spec No**, 1465-70 (1996).
59. Bredezen, D. E. et al. Cell death mechanisms in ALS. *Neurology* **47**, S36-8; discussion S38-9 (1996).
60. Bracco, F., Scarpa, M., Rigo, A. & Battistin, L. Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents in the cerebrospinal fluid of aging brain and neurologic degenerative diseases. *Proc Soc Exp Biol Med* **196**, 36-41 (1991).
61. Imlay, J. A., Chin, S. M. & Linn, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* **240**, 640-2 (1988).
62. Deng, H. X. et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* **261**, 1047-51 (1993).
63. Rosen, D. R. et al. A frequent ala 4 to val superoxide dismutase-1 mutation is associated with a rapidly progressive familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* **3**, 981-7 (1994).
64. Garofalo, O. et al. Superoxide dismutase activity in lymphoblastoid cells from motor neurone disease/amyotrophic lateral sclerosis (MND/ALS) patients. *J Neurol Sci* **129 Suppl**, 90-2 (1995).
65. Aoki, M. et al. Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation. *Nat Genet* **5**, 323-4 (1993).
66. Tsuda, T. et al. Analysis of the functional effects of a mutation in SOD1 associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **13**, 727-36 (1994).
67. Borchelt, D. R. et al. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8292-6 (1994).
68. Borchelt, D. R. et al. Superoxide dismutase 1 subunits with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis do not affect wild-type subunit function. *J Biol Chem* **270**, 3234-8 (1995).
69. Gurney, M. E. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772-5 (1994).
70. Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H. & Gordon, J. W. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 689-93 (1995).
71. Wong, P. C. et al. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* **14**, 1105-16 (1995).
72. Reaume, A. G. et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* **13**, 43-7 (1996).
73. Shefner, J. M. et al. Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* **53**, 1239-46 (1999).
74. Bruijn, L. I. et al. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* **281**, 1851-4 (1998).
75. Rabizadeh, S. et al. Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3024-8 (1995).
76. Brown, R. H., Jr. Amyotrophic lateral sclerosis: recent insights from genetics and transgenic mice. *Cell* **80**, 687-92 (1995).
77. Wiedau-Pazos, M. et al. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **271**, 515-8 (1996).

78. Yim, M. B. et al. A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5709-14 (1996).
79. Abe, K., Pan, L. H., Watanabe, M., Kato, T. & Itoyama, Y. Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **199**, 152-4 (1995).
80. Beal, M. F. et al. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **42**, 644-54 (1997).
81. Ferrante, R. J. et al. Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Ann Neurol* **42**, 326-34 (1997).
82. Beckman, J. S., Carson, M., Smith, C. D. & Koppenol, W. H. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* **364**, 584 (1993).
83. Casareno, R. L., Waggoner, D. & Gitlin, J. D. The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* **273**, 23625-8 (1998).
84. Lyons, T. J. et al. Mutations in copper-zinc superoxide dismutase that cause amyotrophic lateral sclerosis alter the zinc binding site and the redox behavior of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12240-4 (1996).
85. Crow, J. P., Sampson, J. B., Zhuang, Y., Thompson, J. A. & Beckman, J. S. Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J Neurochem* **69**, 1936-44 (1997).
86. Radunovic, A. et al. Copper and zinc levels in familial amyotrophic lateral sclerosis patients with CuZnSOD gene mutations. *Ann Neurol* **42**, 130-1 (1997).
87. Durham, H. D., Roy, J., Dong, L. & Figlewicz, D. A. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 523-30 (1997).
88. Kunst, C. B., Mezey, E., Brownstein, M. J. & Patterson, D. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nat Genet* **15**, 91-4 (1997).
89. Coyle, J. T. & Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-95 (1993).
90. Parkes, T. L. et al. Extension of Drosophila lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet* **19**, 171-4 (1998).
91. Melov, S. et al. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* **289**, 1567-9 (2000).
92. Mecocci, P. et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* **34**, 609-16 (1993).
93. Cha, C. I. et al. Immunocytochemical study on the distribution of nitrotyrosine in the brain of the transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation. *Brain Res* **853**, 156-61 (2000).
94. Tohgi, H. et al. Increase in oxidized NO products and reduction in oxidized glutathione in cerebrospinal fluid from patients with sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **260**, 204-6 (1999).
95. Tohgi, H. et al. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **46**, 129-31 (1999).
96. Buijn, L. I. et al. Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7606-11 (1997).

97. Jansen, G. A., Wanders, R. J., Jobsis, G. J., Bolhuis, P. A. & de Jong, J. M. Evidence against increased oxidative stress in fibroblasts from patients with non-superoxide-dismutase-1 mutant familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **139 Suppl**, 91-4 (1996).
98. Bogdanov, M. B., Ramos, L. E., Xu, Z. & Beal, M. F. Elevated "hydroxyl radical" generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **71**, 1321-4 (1998).
99. Liu, R., Althaus, J. S., Ellerbrock, B. R., Becker, D. A. & Gurney, M. E. Enhanced oxygen radical production in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **44**, 763-70 (1998).
100. Singh, R. J. et al. Reexamination of the mechanism of hydroxyl radical adducts formed from the reaction between familial amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn superoxide dismutase mutants and H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6675-80 (1998).
101. Gurney, M. E. et al. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **39**, 147-57 (1996).
102. Troy, C. M. & Shelanski, M. L. Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6384-7 (1994).
103. Vyth, A., Timmer, J. G., Bossuyt, P. M., Louwse, E. S. & de Jong, J. M. Survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis, treated with an array of antioxidants. *J Neurol Sci* **139 Suppl**, 99-103 (1996).
104. Louwse, E. S., Weverling, G. J., Bossuyt, P. M., Meyjes, F. E. & de Jong, J. M. Randomized, double-blind, controlled trial of acetylcysteine in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* **52**, 559-64 (1995).
105. Menzies, F. M., Ince, P. G. & Shaw, P. J. Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Int* **40**, 543-51 (2002).
106. Afifi, A. K., Aleu, F. P., Goodgold, J. & MacKay, B. Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **16**, 475-81 (1966).
107. Atsumi, T. The ultrastructure of intramuscular nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* **55**, 193-8 (1981).
108. Nakano, Y., Hirayama, K. & Terao, K. Hepatic ultrastructural changes and liver dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* **44**, 103-6 (1987).
109. Okamoto, K., Hirai, S., Shoji, M., Senoh, Y. & Yamazaki, T. Axonal swellings in the corticospinal tracts in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* **80**, 222-6 (1990).
110. Sasaki, S. & Iwata, M. Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **204**, 53-6 (1996).
111. Shaw, P. J., Ince, P. G., Falkous, G. & Mantle, D. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* **38**, 691-5 (1995).
112. Bowling, A. C., Schulz, J. B., Brown, R. H., Jr. & Beal, M. F. Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **61**, 2322-5 (1993).
113. Chen, J., Schenker, S., Frosto, T. A. & Henderson, G. I. Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits. *Biochim Biophys Acta* **1380**, 336-44 (1998).
114. Picklo, M. J., Amarnath, V., McIntyre, J. O., Graham, D. G. & Montine, T. J. 4-Hydroxy-2(E)-nonenal inhibits CNS mitochondrial respiration at multiple sites. *J Neurochem* **72**, 1617-24 (1999).

115. Smith, R. G., Henry, Y. K., Mattson, M. P. & Appel, S. H. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **44**, 696-9 (1998).
116. Browne, S. E. et al. Metabolic dysfunction in familial, but not sporadic, amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **71**, 281-7 (1998).
117. Fujita, K. et al. Decreased cytochrome c oxidase activity but unchanged superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* **45**, 276-81 (1996).
118. Borthwick, G. M., Johnson, M. A., Ince, P. G., Shaw, P. J. & Turnbull, D. M. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann Neurol* **46**, 787-90 (1999).
119. Vielhaber, S. et al. Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **123** (Pt 7), 1339-48 (2000).
120. Wiedemann, F. R. et al. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **156**, 65-72 (1998).
121. Dhaliwal, G. K. & Grewal, R. P. Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains. *Neuroreport* **11**, 2507-9 (2000).
122. Swerdlow, R. H. et al. Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **153**, 135-42 (1998).
123. Curti, D. et al. Amyotrophic lateral sclerosis: oxidative energy metabolism and calcium homeostasis in peripheral blood lymphocytes. *Neurology* **47**, 1060-4 (1996).
124. Carri, M. T. et al. Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* **414**, 365-8 (1997).
125. Siklos, L. et al. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **39**, 203-16 (1996).
126. Wakai, M., Mokuno, K., Hashizume, Y. & Kato, K. An immunohistochemical study of the neuronal expression of manganese superoxide dismutase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* **88**, 151-8 (1994).
127. Shaw, P. J., Chinnery, R. M., Thagesen, H., Borthwick, G. M. & Ince, P. G. Immunocytochemical study of the distribution of the free radical scavenging enzymes Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1); MN superoxide dismutase (MN SOD) and catalase in the normal human spinal cord and in motor neuron disease. *J Neurol Sci* **147**, 115-25 (1997).
128. Blaauwgeers, H. G., Vianney de Jong, J. M., Verspaget, H. W., van den Berg, F. M. & Troost, D. Enhanced superoxide dismutase-2 immunoreactivity of astrocytes and occasional neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **140**, 21-9 (1996).
129. Liu, Y., Brooks, B. R., Taniguchi, N. & Hartmann, H. A. CuZnSOD and MnSOD immunoreactivity in brain stem motor neurons from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol (Berl)* **95**, 63-70 (1998).
130. Radunovic, A., Porto, W. G., Zeman, S. & Leigh, P. N. Increased mitochondrial superoxide dismutase activity in Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Neurosci Lett* **239**, 105-8 (1997).
131. McEachern, G. et al. Manganese superoxide dismutase levels are elevated in a proportion of amyotrophic lateral sclerosis patient cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 359-63 (2000).
132. Dal Canto, M. C. & Gurney, M. E. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing

- wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* **676**, 25-40 (1995).
133. Mourelatos, Z., Gonatas, N. K., Stieber, A., Gurney, M. E. & Dal Canto, M. C. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5472-7 (1996).
 134. Kong, J. & Xu, Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* **18**, 3241-50 (1998).
 135. Klivenyi, P. et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* **5**, 347-50 (1999).
 136. Alberca, R., Castilla, J. M. & Gil-Peralta, A. Hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **50**, 201-6 (1981).
 137. Jackson, M. et al. Copper/zinc superoxide dismutase 1 and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: analysis of 155 cases and identification of a novel insertion mutation. *Ann Neurol* **42**, 803-7 (1997).
 138. Sapp, P. C. et al. Identification of three novel mutations in the gene for Cu/Zn superoxide dismutase in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord* **5**, 353-7 (1995).
 139. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. & Hayashi, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**, 874-9 (1989).
 140. DiMauro, S. et al. Mitochondrial myopathies. *J Inherit Metab Dis* **10 Suppl 1**, 113-28 (1987).
 141. Lagendijk, J., Ubbink, J. B. & Vermaak, W. J. Measurement of the ratio between the reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human plasma as a possible marker of oxidative stress. *J Lipid Res* **37**, 67-75 (1996).
 142. Spitz, D. R. & Oberley, L. W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* **179**, 8-18 (1989).
 143. Przedborski, S. et al. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in copper/zinc-superoxide dismutase transgenic mice. *J Neurochem* **58**, 1760-7 (1992).
 144. Sinet, P. M., Michelson, A. M., Bazin, A., Lejeune, J. & Jerome, H. Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. *Biochem Biophys Res Commun* **67**, 910-5 (1975).
 145. Williams, A. J., Coakley, J. C. & Christodoulou, J. Flow cytometric evaluation of defects of the mitochondrial respiratory chain. *J Child Neurol* **14**, 518-23 (1999).
 146. Hedley, D. W. & Chow, S. Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry* **15**, 349-58 (1994).
 147. Reers, M., Smith, T. W. & Chen, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* **30**, 4480-6 (1991).
 148. Campos, Y. et al. Clinical heterogeneity associated with mitochondrial DNA depletion in muscle. *Neuromuscul Disord* **8**, 568-73 (1998).
 149. Altschul, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402 (1997).
 150. Andersen, P. M. et al. Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **4**, 62-73 (2003).
 151. Shaw, C. E. et al. Mutations in all five exons of SOD-1 may cause ALS. *Ann Neurol* **43**, 390-4 (1998).

152. Boukaftane, Y. et al. Identification of six novel SOD1 gene mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Can J Neurol Sci* **25**, 192-6 (1998).
153. Jones, C. T., Swingle, R. J., Simpson, S. A. & Brock, D. J. Superoxide dismutase mutations in an unselected cohort of Scottish amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Med Genet* **32**, 290-2 (1995).
154. Rowland, L. P. & Shneider, N. A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* **344**, 1688-700 (2001).
155. Esteban, J. et al. Identification of two novel mutations and a new polymorphism in the gene for Cu/Zn superoxide dismutase in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* **3**, 997-8 (1994).
156. García Triana, B., García Morales, O., Clapes Hernández, S., Rodes Fernández, L. & García Piñero, J. C. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I : superóxido dismutasas. *Rev Cubana Inv Biom* **14**, 5-12 (1995).
157. Cleveland, D. W. & Rothstein, J. D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* **2**, 806-19 (2001).
158. Higgins, C. M., Jung, C. & Xu, Z. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* **4**, 16 (2003).

ANEXOS

1 Anexo 1: Enfermedades de NM en el adulto

	Esclerosis Lateral Amiotrófica	Atrofia Muscular Progresiva	Atrofia Muscular Espinal de inicio tardío	Esclerosis Lateral Primaria	Enfermedad de Kennedy	Parálisis Bulbar Progresiva	Esclerosis Lateral Amiotrófica Monomiélica	Diplegia Amiotrófica
Distribución típica de la debilidad	Distal asimétrica	Distal asimétrica	Distal ó proximal simétrica	Distal asimétrica	Proximal simétrica	Inicialmente limitada a músculos bulbares	Asimétrica restringida a 1-2 extremidades superiores	Proximal y simétrica de extremidades superiores
Signos de NMS	Presentes	Ausentes	Ausentes	Presentes	Ausentes	Presentes	Ausentes	Ausentes
Signos de NMI	Presentes	Presentes	Presentes	Ausentes	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes
Pérdida sensitiva	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Modesta	Ausente	20%	Ausente
Genética	AD (10%) mutaciones en <i>SOD1</i> (2%)	Desconocida	AR, AD con implicación del gen SMN	Desconocida (no hay casos familiares publicados)	XR con > 40 repeticiones CAG	Desconocida (no hay casos familiares publicados)	Desconocida	Desconocida
Características diferenciales	Signos de NMS y NMI con rápida progresión generalmente	Enfermedad de NMI pura con curso habitualmente indolente	Enfermedad de NMI pura con debilidad proximal progresiva con el paso de décadas	Enfermedad de NMS pura con curso lentamente progresivo	Ginecomastia, diabetes mellitus, impotencia, infertilidad, calambres musculares, fasciculaciones profusas	Debilidad inicialmente limitada a músculos bulbares. Puede que progrese rápidamente a ELA o ser relativamente indolente	Progresión de unos 2-3 años con subsecuente estabilización típicamente de inicio juvenil	Mantenimiento de la función lumbar y respiratoria con progresión lenta

Anexo 1

Características clínicas de enfermedades de neurona motora de inicio adulto

2 Anexo 2: Secuencia del gen humano *SOD1*

Exón 1

5' tcgCGGagaggggtgctg**gtttgCGtcgtagtctcctgca**gcgtctggggttccggtgcagtc
ctCGgaaccaggacctcggcgtggcctagcagttATG**gCGacgaaggccgtgtgCGtgcTgaagg**
gCGacggcccagTgcagggcatcatcaatttcgagcagaagGCaagggtgggaccggg**aggcttg**
tGttgCGaggccgctcccgaccgctcgtccccccgc 3'

Exón 2

5' ctgtgaggggtaaaggtaaatacagctgTTTTctttg**ttcagaaactctctccaactt**tgcaactt
ttcttaaAG**gaaagtaatggaccagtgaaggtgtggggaagcattaaaGgactgactgaaggcctg**
catggattccatgTtcatgagTttggagataatacagcagGTgggtgtgtgctgtgctggtgacc
catacttgttcaccctagttagataaa**acagtagagtagccctaaacg**ttaaaaccctcaacttg
TTTTgTTTTtgagaaagg 3'

Exón 3

5' gtgtttcttttta**gaatgtatttgggaactttaatt**cataatttagctTTTTttcttcttctt
ataaatAG**gctgtaccagTgcaggtcctcactttaatcctctatccagaaacacggTgggcaaa**
ggatgaagagagGTaacaagatgcttaactcttgtaataCaatggcgAtacgttctgagattcata
tggtatactacttgtaaatatgtgcctaagataattccgTgttccccaccttg**cttttgaact**
tgctgactcatTgaaaccctgctcccaaattgctggaatgct 3'

Exón 4

5' taccttgatgtttagtg**catcagccctaattccatctga**tgctttttcattattAG**gcatgttg**
gagactTgggcaatgtgactgctgacaaagatggTgtggccgatgtgtctattgaagattctgtga
tctcactctcagagaccattgcatCattggccgcacactggTgGTaagttttcataaaggatag
cataaaacttcttctaacagtacagtcatgtatctttcacttt**gattgttagtcgCGaattctaag**
atccagataaactgt 3'

Exón 5

5' ttttctaataattatgaggttcttaaacatcttttg**gtattgttgggaggaggtagtgat**tact
tgacagcccaaagttatcttcttaaatTTTTtacAG**gtccatgaaaaagcagatgactTgggcaaa**
ggTggaaatgaagaaagtacaagacaggaacgctggaagtcgTtggcttgtggTgtaattggg
atcgcccaaTAAacattcccttgatgtagtctgaggc**cccttaactcatctgttatcctgc**tagc
tgtagaaatgtatcctgataaacattaaact 3'

Anexo 2

La secuencia de cada exón del gen *SOD1* está subrayada. Los cebadores utilizados en las reacciones de PCR están resaltados con letra rosa y negrita.

3 Anexo 3: CÓDIGO GENÉTICO HUMANO.

Posición inicial	Segunda posición								Posición final
5'	T	C	A	G					3'
T	TTT	Phe	TCT	Ser	TAT	Tyr	TGT	Cys	T
	TTC	“	TCC	“	TAC	“	TGC	“	C
	TTA	Leu	TCA	“	TAA	Ter¹	TGA	Ter³	A
	TTG	“	TCG	“	TAG	Ter²	TGG	Trp	G
C	CTT	“	CCT	Pro	CAT	His	CGT	Arg	T
	CTC	“	CCC	“	CAC	“	CGC	“	C
	CTA	“	CCA	“	CAA	Gln	CGA	“	A
	CTG	“	CCG	“	CAG	“	CGG	“	G
A	ATT	Ile	ACT	Thr	AAT	Asn	AGT	Ser	T
	ATC	“	ACC	“	AAC	“	AGC	“	C
	ATA	“	ACA	“	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	ATG	Met	ACG	“	AAG	“	AGG	“	G
G	GTT	Val	GCT	Ala	GAT	Asp	GGT	Gly	T
	GTC	“	GCC	“	GAC	“	GGC	“	C
	GTA	“	GCA	“	GAA	Glu	GGA	“	A
	GTG	“	GCG	“	GAG	“	GGG	“	G

Anexo 3

Lectura correspondiente a las posibles secuencias nucleotídicas del ADN en tripletes (codones) y su transcripción en aminoácidos

¹Codon de terminación de lectura Ocre.

²Codon de terminación de lectura Ámbar.

³Codon de terminación de lectura “Umber”

4 Anexo 4: Códigos estándar IUB/IUPAC de aminoácidos y ácidos nucleicos.

Excepciones:

1. Se aceptan minúsculas pero son codificadas como letras mayúsculas;
2. Para representar una secuencia desconocida de longitud indeterminada, se puede utilizar un guión;
3. Se admiten U y * como caracteres en secuencias proteicas (ver cuadro).

El código de **ácidos nucleicos** utilizado es:

Símbolo	Tipo de nucleótido	Símbolo	Tipo de nucleótido
A	adenosina	M	A C (amino)
C	citidina	S	G C (fuerte)
G	guanina	W	A T (débil)
T	timidina	B	G T C
U	uridina	D	G A T
R	G A (purina)	H	A C T
Y	T C (pirimidina)	V	G C A
K	G T (ceto)	N	A G C T (cualquiera)

- intervalo de longitud indeterminada

Los códigos aceptados para los **amino ácidos** son:

Símbolo	Tipo de amino ácido	Símbolo	Tipo de amino ácido
A	alanina	P	prolina
B	aspartato o asparragina	Q	glutamina
C	cisteina	R	arginina
D	aspartato	S	serina
E	glutamato	T	treonina
F	fenilalanina	U	selenocisteina
G	glicina	V	valina
H	histidina	W	triptófano
I	isoleucina	Y	tirosina
K	lisina	Z	glutamato o glutamina
L	leucina	X	cualquiera
M	metionina	*	Parada de traducción
N	asparragina	-	intervalo de longitud indeterminada

Anexo 4

Codificación nucleotídica y aminoacídica estándar

5 Anexo 5: Publicaciones relacionadas con la tesis

6 Anexo 6: Otras publicaciones del doctorando

- Campos Y, **García A**, del Hoyo P, Jara P, Martín MA, Rubio JC, Berbel A, Barbera JR, Ribacoba R, Astudillo A, Cabello A, Ricoy JR, Arenas J.
Two pathogenic mutations in the mitochondrial DNA tRNA Leu(UUR) gene (T3258C and A3280G) resulting in variable clinical phenotypes.
Neuromuscul Disord. 2003 Jun;**13(5):416-20.**
- Torróni A, Campos Y, Rengo C, Sellitto D, Achilli A, Magri C, Semino O, **García A**, Jara P, Arenas J, Scozzari R.
Mitochondrial DNA haplogroups do not play a role in the variable phenotypic presentation of the A3243G mutation.
Am J Hum Genet. 2003 Apr;**72(4):1005-12.**
- Arenas J, Fernández-Moreno MA, Molina JA, Fernández V, del Hoyo P, Campos Y, Calvo P, Martín MA, **García A**, Moreno T, Martínez-Salio A, Bornstein B, Bermejo F, Cabello A, Garesse R.
Myoglobinuria and COX deficiency in a patient taking cerivastatin and gemfibrozil.
Neurology. 2003 Jan 14;**60(1):124-6.**
- Campos Y, **García A**, López A, Jiménez S, Rubio JC, Del Hoyo P, Bustos F, Martín MA, Cabello A, Ricoy JR, Arenas J.
Cosegregation of the mitochondrial DNA A1555G and G4309A mutations results in deafness and mitochondrial myopathy.
Muscle Nerve. 2002 Feb;**25(2):185-8**
- Campos Y, **García A**, Eiris J, Fuster M, Rubio JC, Martín MA, del Hoyo P, Pintos E, Castro-Gago M, Arenas J.
Mitochondrial myopathy, cardiomyopathy and psychiatric illness in a Spanish family harbouring the mtDNA 3303C > T mutation.
J Inherit Metab Dis. 2001 Nov;**24(6):685-7**
- Campos Y, **García-Redondo A**, Fernández-Moreno MA, Martínez-Pardo M, Goda G, Rubio JC, Martín MA, del Hoyo P, Cabello A, Bornstein B, Garesse R, Arenas J.
Early-onset multisystem mitochondrial disorder caused by a nonsense mutation in the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase II gene.
Ann Neurol. 2001 Sep;**50(3):409-13**
- Campos Y, Gámez J, **García A**, Andreu AL, Rubio JC, Martín MA, del Hoyo P, Navarro C, Cervera C, Garesse R, Arenas J.
A new mtDNA mutation in the tRNA(Leu(UUR)) gene associated with ocular myopathy
Neuromuscul Disord 2001 Jul;**11(5):477-80**
- Martín MA, Rubio JC, **García A**, Fernández MA, Campos Y, Krawczak M, Cooper DN, Arenas J
Resolution of a mispaired secondary structure intermediate could account for a novel micro-insertion/deletion (387 insA/del 8 bp) in the PYGM gene causing McArdle's disease.
Clin Genet 2001; **59:48-51**
- Molina JA, de Bustos F, Jiménez-Jiménez FJ, Gómez-Escalonilla C, **García-Redondo A**, Esteban J, Guerrero-Sola A, del Hoyo P, Martínez-Salio A, Ramírez-Ramos C, Indurain GR, Arenas J.
Serum levels of conzyme Q₁₀ in patients with amyotrophic lateral sclerosis.
J Neural Transm 2000;**107(8-9):1021-6**
- Campos Y, Lorenzo G, Martín MA, Torregrosa A, del Hoyo P, Rubio JC, **García A**, Arenas J.
A mitochondrial tRNA^{Lys} gene mutation (T8316C) in a patient with mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes.
Neuromuscul Disord. 2000 Oct;**10(7):493-6**
- de Bustos F, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, **García-Redondo A**, Gómez-Escalonilla C, Porta-Etessam J, Berbel A, Zurdo M, Barcenilla B, Parrilla G, Enríquez-de-Salamanca R, Arenas J.

Serum levels of conzyme Q₁₀ in patients with Alzheimer's disease.
J Neural Transm 2000;107(2):233-9

Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, de Bustos F, **García-Redondo A**, Gómez-Escalonilla C, Martínez-Salio A, Berbel A, Camacho A, Zurdo M, Barcenilla B, Enríquez-de-Salamanca R, Arenas J.

Serum levels of conzyme Q₁₀ in patients with Parkinson's disease.
J Neural Transm 2000;107(2):177-81

Martín MA, Rubio JC, del Hoyo P, **García A**, de Bustos F, Campos Y, Cabello A, Culebras JM, Arenas J.

Identification of novel mutations in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency.

Hum Mutat 2000 Jun;15(6):579-80

Martin MA, Campos Y, Garcia-Silva MT, Rubio JC, Del Hoyo P, de Bustos F, **García A**, Arenas J
Slow segregation and rapid shift to homoplasmy coexist in a family with the T8993 > G mutation.

J Inherit Metab Dis 1999 Dec;22(8):939-40

Martín MA, Rubio JC, de Bustos F, del Hoyo P, Campos Y, **García A**, Borstein B, Cabello A, Arenas J.

Molecular analysis in Spanish patients with carnitine palmitoyltransferase deficiency.

Muscle Nerve 1999 Jul;22(7):941-3

Rubio JC, Martín MA, **García A**, Campos Y, Cabello A, Culebras JM, Arenas J.

McArdle's disease associated with homozygosity for the missense mutation Gly204Ser of the myophosphorylase gene in a spanish patient.

Neuromuscul Disord 1999 May;9(3):174-5.

A. García Redondo, Y. Campos González y J. Arenas Barbero.

Disfunción Mitocondrial en la E.L.A.

Esclerosis Lateral Amiotrófica. 1999. Capítulo 17. Ed. Prous Science

La labor de la investigación es un trabajo variable, al principio crees que va a ser muy especial, con el tiempo te encuentras con la rutina, de pronto disfrutas del logro obtenido y finalmente asumes que tu pequeña labor puede apoyar el trabajo de muchos otros...

(me alegro de haber tenido la oportunidad de vivir dentro de este mundo tan especial y tan diferente, de disfrutarlo, y de enriquecerme personal, intelectual y profesionalmente en él, siempre ayudado por el deseo de creatividad y las ganas de aprender)

... sólo quienes aceptan las cosas como son, soportan la incertidumbre científica.

Gracias de nuevo **Joaquín y Jesús** por esta gran oportunidad, por vosotros

Fdo.: Alberto García Redondo