

FUNDELA

Boletín Científico 35

El boletín de FUNDELA publica resúmenes y artículos científicos referentes a los últimos avances de la investigación, tratamientos sintomáticos y cuidados al paciente con ELA.

Se envía periódicamente a más de 400 suscriptores, entre los que se encuentran profesionales de la salud, pacientes y familiares de España y Latinoamérica.

Todos los boletines pueden descargarse en nuestra web www.fundela.es

FUNDELA no asume responsabilidades por la información que contiene este boletín.



Necesitamos ayuda económica para continuar en los proyectos que indicamos a continuación

● **PROYECTOS PILOTO DE DETERMINACION DE DIFERENTES POSIBLES BIOMARCADORES EN PLASMA Y CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA EN PACIENTES CON ELA**

● **VALORACIÓN DEL ESTRÉS POSTRAUMÁTICO EN PERSONAS CON ELA**

Describir los factores que influyen en la presencia de estrés posttraumático en las personas con ELA y adaptar y/o elaborar procedimientos más adecuados a sus dificultades

● **BOLETIN CIENTIFICO**

Actualmente contamos con subvenciones de Asociación ELA Principado, La Caixa, Caja Navarra, Larios y aportaciones particulares de pacientes y familiares que sufren la ELA. Su donativo le dará derecho a practicar una deducción en la cuota del impuesto sobre la renta. La deducción será del 25% como persona física y del 35% como empresa.

Para realizar donaciones económicas pedimos suscribirse en nuestra página web:

<http://www.fundela.es/captaBanco.php>

Colaboradores voluntarios de este número:

D. Adrián G. Rodríguez Barbero – Biólogo
Dr. Alberto García Redondo – Bioquímico, Investigador Hospital 12 de octubre
Dra. Teresa Salas – Psicóloga, Investigadora Hospital Carlos III

Dra. María Luisa Fajardo – Epidemióloga, Consejería de Salud Andalucía
Dra. María Teresa Solas – Dra. en Biología, Investigadora Universidad Complutense
Dr. Jesús S. Mora Pardina – Dr. en Neurología, Director de la Unidad de ELA e Investigador Hospital Carlos III

Sumario

03

EDITORIAL.

04

EL ÚLTIMO RATÓN TRANSGÉNICO EN TDP-43 UNE LA PATOLOGÍA EN LA ELA CON LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL (AME).

05

UN ESTUDIO HA CONFIRMADO LA PRESENCIA DE FACTORES DE RIESGO DE PADECER ELA LOCALIZADOS EN EL CROMOSOMA 9.

07

MALFORMACIÓN MITOCONDRIAL EN EL RATÓN TDP-43

9

LAS GRANDES PROLONGACIONES DE POLIGLUTAMINAS EN EL GEN DE LA ATAXINA-2 AUMENTAN EL RIESGO DE PADECER ELA.

CÓMO AYUDAN LOS MODELOS ANIMALES EN LA LUCHA CONTRA LA ELA.

10

MICROARRAYS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES EN ELA

11

NEUROTECH PHARMACEUTICALS ANUNCIA EL INICIO DE LA FASE 1 DEL ENSAYO CLÍNICO PARA AAD-2004...

12

PRESERVACIÓN DE LAS CÉLULAS NERVIOSAS EN ENFERMEDEDES DE NEURONA MOTORA

QUEBEC: DESENTRAÑANDO LA FUNCIÓN DE TDP-43

14

QUEBEC: NEURONAS MOTORAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE

15

PERSPECTIVAS INTERNACIONALES SOBRE PRACTICA ASISTENCIAL

Ante todo y, con la intención de continuar enviando información actualizada acerca de la ELA, enfermedad que, cada vez conocemos en más profundidad... queremos desearles a todos un MUY FELIZ AÑO 2011.

Durante los días 11 a 13 de diciembre de 2010 tuvo lugar el vigésimo primer congreso internacional de esclerosis lateral amiotrófica (21st International Symposium on ALS/MND) en el hotel Marriot Grande Lakes de la ciudad de Orlando, Florida, EE.UU.

Al igual que siempre, la intención de FUNDELA mediante la difusión de este boletín es la de actualizar en lo posible los últimos avances en investigación en ELA. De este modo, y debido a cada vez mayor número de investigadores y laboratorios, a lo largo y ancho del mundo, obtienen más y mejores resultados, facilitando la comprensión de los porqués y cómo de la enfermedad, hemos decidido publicar dos boletines en el breve plazo de un mes.

En el presente boletín, hemos incluido los avances más destacados de la investigación en ELA del año 2010, tratados, en este congreso, y que creemos, van a dar bastante que hablar en el año venidero.

Sin lugar a dudas, el tema más candente en la actualidad es cómo se produce el proceso neurodegenerativo en relación con las proteínas de procesamiento de ARN implicadas tanto en la ELA familiar como en la esporádica: TDP-43 y FUS. Relacionado con este tema, se han desarrollado varios modelos animales que comienzan a dar los primeros frutos, siendo además, los modelos más prometedores de cara a los futuros ensayos preclínicos.

Uno de los grandes hitos de la conferencia de Orlando fue el trabajo recientemente publicado por el grupo del King's College de Londres en colaboración con otros grupos europeos, fundamentalmente gracias a un nuevo estudio de asociación genómica realizado en Finlandia, que encontró un factor de riesgo a padecer ELA en el cromosoma 9.

Como todos los años, también es habitual que una de las sesiones del congreso se dedique a los descubrimientos en otras enfermedades relacionadas con la ELA, que nos enseñan, características propias de la ELA. En este sentido, durante el año pasado se encontró una relación muy estrecha entre la ELA y la ataxia espinocerebelosa (SCA), observando que el mismo tipo de mutaciones, según su grado de extensión, pueden causar desde un fenotipo de ELA hasta fenotipos más atáxicos.

Respecto a los estudios sobre Biomarcadores, son sin duda, el campo de la investigación que más está creciendo en los últimos años en la ELA, incluimos una noticia sobre este tema en el presente boletín, prometiéndoles que en el siguiente tendrán una información mucho más exhaustiva.

Aprovechando la mención de la existencia del congreso en Canadá, realizados cada dos años, acerca de Deterioro Cognitivo, disfunción en el comportamiento y Demencia Frontotemporal en ELA, el cual está tomando una posición cada vez más importante en el mundo de la investigación en ELA; les incluimos dos partes del congreso que fueron las más relevantes: los hallazgos gracias a los modelos de ratón obtenidos con modificaciones en TARDBP (el gen que codifica por TDP-43) y la utilización de células iPS (modificadas de células de piel humanas) que nos muestran, por un lado cómo las células madre se pueden transformar en neuronas motoras y por el otro el por qué se degeneran más en los pacientes con ELA.

Por último presentaremos un tema del que se habló en 7 conferencias y en distintas reuniones, acerca de la importancia de los cuidados paliativos, un camino plagado de esfuerzos y de conquistas en muchos países, buscando modelos más definidos y cuidados centrados en las personas que sufren ELA.

Dándoos la bienvenida de nuevo a este esperanzador año 2011, os animo a que nos enviéis vuestras dudas sobre los hallazgos de investigación en ELA y, así, poco a poco enriquecer esta publicación que esperamos sea del interés de todos.

Alberto García Redondo

EL ÚLTIMO RATÓN TRANSGÉNICO EN TDP-43 UNE LA PATOLOGÍA EN LA ELA CON LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL (AME).

En la ELA existe una evidencia creciente en que el procesamiento del ARN es clave en su patogénesis molecular.

La Academia Nacional de Ciencias de EEUU ha publicado en el 2010 un estudio, sobre los ratones que sobreexpresan la proteína de unión al sitio TAR de ADN (TDP-43) que, cuando está mutada en humanos, puede causar esclerosis de lateral amiotrófica (ALS) y demencia frontotemporal. Los nuevos datos sugieren que TDP-43 es una de las, al menos, tres proteínas que procesan ARN implicadas en la degeneración de la neurona motora. Los investigadores encontraron TDP-43 en los mismos agregados que FUS, otra proteína de procesamiento de ARN producida a partir de otro gen vinculado a la ELA.

El exceso de TDP-43 también alteró la localización de la proteína SMN o proteína de supervivencia de motoneurona - esta proteína de procesamiento de ARN está codificada por un gen involucrado en la atrofia muscular espinal (AME), otra enfermedad de neurona motora. Además, los investigadores, dirigidos por Philip Wong de la Johns Hopkins University School of Medicine en Baltimore, informaron que los niveles adecuados de TDP-43 son necesarios para la distribución no sólo de las estructuras de procesamiento de ARN en el núcleo, sino también de las mitocondrias en el citoplasma.

Wong y sus colaboradores, para comprender la función fisiológica de TDP-43 en las neuronas motoras, estudian ratones que carecen o sobreexpresan el gen TARDBP (que codifica la proteína TDP-43). "No estamos modelando una enfermedad per se," dijo Wong. "Creemos que, in vivo, las neuronas motoras maduras nos darán una información más valiosa".

Recientemente, los mismos investigadores han desarrollado un ratón knockout condicional de TDP-43, donde la proteína en cuestión une otra proteína necesaria para el metabolismo de la grasa. Una vez que fue eliminada TDP-43, los animales perdieron grasa rápidamente y murieron (Jiang et al., 2010).

Al mismo tiempo, los investigadores Xiu Shan y Po-Min Jiang, ambos de la Universidad de Johns Hopkins, trabajaron sobre el caso contrario a ese ratón knockout: animales que sobreexpresan TDP-43 humana normal a unos niveles superiores de la TDP-43 de ratón.

Los científicos colocaron el transgen humano

bajo el control del promotor Thy1.2 por lo que se activaría en las neuronas después del nacimiento. De las tres líneas transgénicas que obtuvieron, los investigadores seleccionaron la línea de más baja expresión para continuar sus estudios. Aunque los ratones elegidos presentaron un poco de retraso en el crecimiento, y también temblores, sobrevivieron hasta la edad adulta. Los autores no observaron cambios en el metabolismo de la grasa, sin embargo, se encontraron con una redistribución anormal en los orgánulos de las motoneuronas.

"Cuando se sobreexpresa TDP-43, observamos dos fenómenos clave, uno en el compartimiento nuclear y otro en el citoplasma," según el Dr. Wong. En el núcleo, la proteína en exceso forma inclusiones anormales. Y FUS se une a TDP-43 en estas inclusiones, proporcionando la confirmación in vivo de una interacción ya demostrada in vitro. "Esto sugiere la unificación de dos causas distintas observadas en la ELA," comentó Tibbetts Randal de la Universidad de Wisconsin en Madison, quien no estaba involucrada en el estudio.

El otro fenómeno encontrado por Wong era una anomalía en los llamados "Géminis de los cuerpos enrollados" (GEMs) o "Cuerpos de Cajal", otra estructura nuclear.

Los GEMs son sitios de procesamiento de ARN que contienen la proteína SMN (asociada con la atrofia muscular espinal). Las neuronas motoras normalmente contienen dos GEMs en su nucleolo. Pero en los ratones que sobreexpresan TDP-43, las neuronas motoras presentan hasta ocho GEMs, señaló Wong, y tienden a agregarse alrededor del nucleolo en lugar de en su interior. "Probablemente hay graves alteraciones en el metabolismo del ARN en estas neuronas motoras", dijo Tibbetts. Por el contrario, en el ratón knockout de TDP-43, las neuronas motoras no tenían ningún GEM en absoluto.

Los investigadores encontraron también un fenómeno anormal al examinar el citoplasma. En las autopsias de pacientes de ELA, a menudo se observan inclusiones de TDP-43 en el citoplasma. Sin embargo, los investigadores encontraron poco TDP-43 fuera del núcleo en las neuronas de estos nuevos ratones. Vieron inclusiones citoplasmáticas de otro tipo; grandes agregados mitocondriales. Estos agregados han aparecido anteriormente en otros ratones de TDP-43 y sugieren que el metabolismo energético podría estar modificado en las enfermedades de neurona motora.

Para examinar más detenidamente este fenotipo mitocondrial, Wong y sus colegas cruzaron los ratones que sobreexpresan TDP-43 con un tipo de ratón modificado que porta una etiqueta mitocondrial a modo de proteína fluorescente. En los animales normales, las mitocondrias aparecen en el cuerpo de la célula y en los axones, pero en los dobles-transgénicos, las neuronas contenían muchas menos mitocondrias que las neuronas del ratón normal. Una escasez de las mitocondrias en los terminales de los axones de la neurona motora podría debilitar posiblemente las uniones neuromusculares. De hecho, los investigadores encontraron que las uniones estaban infradesarrolladas y las fibras musculares eran más pequeñas de lo normal.

Entonces, ¿por qué hay tan pocas mitocondrias en los extremos de los axones? En busca de pistas, estos investigadores analizaron ARN mensajero de médula espinal de tres ratones TDP-43 y de tres de ratones normales como control. Usaron la secuenciación diferencial de ADNc para cuantificar la cantidad de ARNm expresado, ya que permite la identificación de las distintas isoformas producidas por procesamiento alternativo. Los investigadores descubrieron 2.017 genes de expresión diferencial entre las líneas de ratón, y 313 con diferentes patrones de procesamiento en los ratones que sobreexpresan TDP-43. En particular, los ratones TDP-43 mostraban menos ARNm codificante de proteínas implicadas en la formación del citoesqueleto y el transporte a través de él. "Tal vez", Wong especula, "estamos truncando el transporte axonal". Otros investigadores han propuesto que la alteración en la fisión y fusión mitocondrial puede estar detrás de los síntomas observados en los ratones TDP-43, "lo que podría tener sentido también" dijo Wong.

Bob Baloh, de la Universidad de Washington en St. Louis, Missouri, quien tampoco estaba involucrado en el estudio, señaló que los problemas mitocondriales han sido de elevado interés en ratones que sobreexpresan la versión humana de la SOD1, otro gen vinculado a la ELA. La presencia de agregados mitocondriales sugiere una similitud potencial entre TDP-43 y ratones SOD1, dice Baloh.

El nuevo ratón también sigue la tendencia en modelos de ratón de las TDP-43-proteinopatías (entre las que se encuentra la ELA y algunos tipos de demencias). "Todos ellos presentan en gran medida el mismo aspecto, con síntomas similares de enfermedad y localización nuclear de TDP-43" apuntó Baloh.

Referencia:

Shan X, Chiang PM, Price DL, Wong PC. Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Aug 24.

UN ESTUDIO HA CONFIRMADO LA PRESENCIA DE FACTORES DE RIESGO DE PADECER ELA LOCALIZADOS EN EL CROMOSOMA 9.

Dos estudios genéticos descritos en la edición de agosto de 2010 en "The Lancet Neurology" señalan el brazo corto (p) del cromosoma 9, como portador de factores de riesgo importantes para el desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Por desgracia, la secuenciación simple no ha podido desvelar la mutación responsable. Los documentos publicados el 27 de agosto de 2010, describen estudios de asociación genética global o GWAS (Genome Wide Association Study) en una población finlandesa y en otros grupos diversos, con un estudio sobre el Reino Unido, incluyendo todos los datos GWAS publicados hasta la fecha mediante metaanálisis. Así, se ha visto que una zona del cromosoma 9 es bastante intrigante.

Varios estudios han sugerido previamente que algún factor de riesgo genético para la ELA y la demencia frontotemporal (DFT) reside en el brazo corto del cromosoma 9.

Los dos documentos actuales proporcionan una confirmación importante. "Es como ApoE en Alzheimer", ha comentado Pentti Tienari de la Universidad de Helsinki, Finlandia y Bryan Traynor del Instituto Nacional sobre el envejecimiento en Bethesda, Maryland (EE.UU.) que se ocuparon de los análisis en Finlandia. Se sabe que la población Finlandesa es genéticamente más homogénea que la mayoría, lo que es muy útil para los cazadores de genes. Los finlandeses tienen una alta tasa de enfermedades genéticas, incluyendo la ELA. De hecho, Finlandia tiene la mayor incidencia de ELA fuera de la cuenca del Pacífico, donde surgió una forma inusual de ELA en Guam y otros lugares aislados. "Nuestro GWAS, por primera vez en cualquier población, es capaz de explicar este exceso de casos de ELA en escandinavia", asegura Traynor.

Los investigadores, incluyendo a los coautores Hannu Laaksovirta y Peuralinna de Terhi de la Universidad de Helsinki y Jennifer Schymick, estudiaron el ADN de 405 personas con ELA y

497 casos control. Encontraron una fuerte asociación entre polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) cerca del gen para la superóxido dismutasa (SOD1) — un gen asociado a la ELA — así como cerca del locus 9p21. Las personas con la enfermedad ligada a SNPs en el locus citado incluyen 44 individuos con antecedentes familiares de ELA, así como 58 con la enfermedad aparentemente esporádica.

Sin embargo, según Traynor, un caso que parece esporádico no tiene por qué ser necesariamente una nueva mutación, de forma que algunas de esas personas puedan haber heredado el gen. Rademakers añadió que este factor de riesgo desconocido podría tener penetrancia incompleta, lo que podría hacer que no se desarrolle ELA en el portador. Casos esporádicos pueden tener un padre que no enfermó, o que no vivió lo suficiente para mostrar síntomas. La ELA y la DFT parecen ser los extremos opuestos de un espectro de una enfermedad con causas moleculares similares. Existen evidencias previas de estudios de ligamiento en varias familias con demencia frontotemporal en que se ha encontrado una relación con este locus del cromosoma 9.

Científicos del Reino Unido tomaron un rumbo distinto. El grupo, liderado por Aleksey Shatunov y Ammar Al-Chalabi del King's College de Londres, por primera vez llevó a cabo un estudio local con 599 pacientes y 4144 controles. Recopilaron datos de todos los GWAS anteriores en ELA, para un total de 4312 pacientes y 8425 controles, Traynor fue también colaborador en este estudio. El único locus que alcanzó significación estadística fue el 9p21. Sin embargo, el estudio no pudo encontrar significación estadística para otros loci más pequeños de los GWAS vinculados a la ELA.

El hallazgo de 9p21 en esta diversa y gran colección de muestras sugiere que puede ser el factor de riesgo genético más significativo para la ELA. El hallazgo más importante de este estudio es que ninguno de los SNPs previamente asociados en ITPR2, FGGY, DPP6 y UNC13A mostró significación estadística.

La región 9p21 de interés que Traynor y sus colegas han fijado, se reduce a 232 kilobases, contiene tres genes conocidos, y ninguno de ellos está relacionado en principio con la enfermedad de neurona motora: MOBKL2B regula quinasas; IFNK es un precursor de interferón involucrado en la inmunidad frente a virus; C9orf72, se cree, podría tener una función en la espermatogénesis. Traynor y sus colaboradores han secuenciado las regiones de codificación para los tres genes, pero no encontraron nada sospechoso.

Sin embargo, hay varios tipos de mutaciones que la secuenciación podría haber pasado por alto. Se sugiere que la mutación podría caer en un gen desconocido o que podría ser una inversión, que sería difícil de atrapar a través de secuenciación. Rademakers dijo que si bien las deleciones pequeñas y grandes son fáciles de encontrar, podrían perderse las de tamaño mediano. O es posible, aunque poco probable, que la mutación no esté en la región definida. El marcador real de interés podría estar hasta un millón de bases más lejos del SNP asociado. La secuenciación de alto rendimiento y de nueva generación a través de toda la región, añadiendo los avances bioinformáticos y la cooperación entre grupos, es el camino a seguir para localizar correctamente el factor genético de riesgo que marca esta zona del cromosoma 9.

Lo ideal es que los clínicos podrían disponer de una prueba genética que se utilizara para el diagnóstico y el consejo genético, la identificación de esta mutación dará pistas sobre el proceso de la enfermedad y posibles tratamientos potenciales dijo Adam Boxer, de la Universidad de California en San Francisco, quien no estaba involucrado en estos estudios. Esta mutación de hecho, podría decirnos mucho sobre las TDP43-proteinopatías y el mecanismo subyacente, añadió.

Referencias:

Shatunov A, Mok K, Newhouse S, Weale M, Smith B, Vance C, Johnson L, Veldink JH, van Es MA, van den Berg LH, Robberecht W, Van Damme P, Hardiman O, Farmer AE, Lewis CM, Butler AW, Abel O, Andersen PM, Fogh I, Silani V, Chi A, Traynor BJ, Melki J, Meininger V, Landers JE, McGuffin P, Glass JD, Pall H, Leigh PN, Hardy J, Brown RH Jr, Powell JF, Orrell RW, Morrison KE, Shaw PJ, Shaw CE, Al-Chalabi A. Chromosome 9p21 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the UK and seven other countries: a genomewide association study. *Lancet Neurol.* 2010 Aug 27.

Laaksovirta H, Peuralinna T, Schymick JC, Scholz SW, Lai SL, Myllykangas L, Sulkava R, Jansson L, Hernandez D, Gibbs JR, Nalls MA, Heckerman D, Tienarit PJ, Traynor BJ. Chromosome 9p12 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genomewide association study. *Lancet Neurol.* 2010 Aug 27.

Daoud H, Belzil V, Dion PA, Rouleau GA. Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis: the plot thickens. *Lancet Neurol.* 2010 Aug 27.

MALFORMACIÓN MITOCONDRIAL EN EL RATÓN TDP-43

Un nuevo ratón, desarrollado en la Clínica Mayo de Jacksonville - Florida, para el estudio de las TDP proteinopatías fue presentado a la comunidad científica en Honolulu durante el verano de 2010. El animal sobreexpresa la versión humana normal de TDP-43.

Los investigadores, dirigidos por Ya-Fei Xu, Jada Lewis y Leonard Petrucelli, mediante ingeniería genética han desarrollado ratones que portan el gen humano de TDP-43 bajo el promotor de PrP (el gen codificante por la proteína priónica), por lo que la proteína se expresa sólo en el cerebro y la médula espinal. Los homocigotos presentaron aproximadamente 2,5 veces más TDP-43 de lo que se encuentra normalmente en los ratones normales. La proteína en su versión humana superó en expresión a la de la versión de ratón; los animales transgénicos tuvieron menos TDP-43 de ratón que los ratones no transgénicos, aunque tenían más proteína TDP-43 total.

Anteriormente se observó, en ratones que portan la versión mutante humana de TDP-43 (TDP-43-A315T) bajo el promotor de PrP, que estos animales mostraban peso corporal y cerebral bajo, acompañando a un deterioro de la función motora. Estos dos modelos con expresión dirigida por PrP, así como los ratones con TDP-43 normal humana con el promotor neuronal Thy-1 de ratón, comparten tanto agregados insolubles de TDP-43 como el hecho de que la proteína presenta truncado el extremo carboxilo terminal, dos fenómenos asociados a la patología neuronal. Al igual que con los otros modelos, el equipo de la clínica Mayo encontró que TDP-43 en su mayoría es de localización nuclear, con redistribución ocasional citoplasmática, pero de una forma no tan drástica como en los casos observados de ELA humana.

Además, los científicos de la clínica Mayo observaron grandes agregados en el citoplasma de las neuronas motoras de la médula espinal en sus animales modelo. Cuando examinaron estas formaciones con microscopía electrónica, descubrieron que los agregados estaban formados por mitocondrias anormales. Éstas presentaban menos pliegues de lo normal en la membrana interna y vacuolas dentro de la matriz, lo que sugiere que estaban sufriendo un proceso degenerativo.

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que se dividen con frecuencia, a través de la fisión y se unen entre sí, mediante fusión. Si estos procesos se modifican, pueden aparecer agregados mitocondriales anormales. Así, los científicos exami-

naron los mecanismos de la fusión y de la fisión en los ratones de TDP-43. El sistema de fisión, representado por FIS1 y DLP1 fosforilada, estaba sobrestimulado en los animales modelo. Por el contrario, los niveles de la proteína de fusión mitofusina 1 se encontraban disminuidos en los animales que sobreexpresaban TDP-43 humana. Las malformaciones mitocondriales ya se han vinculado anteriormente a la ELA. Se sugiere que los problemas que afectan a la actividad nuclear normal de TDP-43 llevan, indirectamente y quizás por la alteración de la expresión génica, a perturbar el tráfico mitocondrial o provocar fallos en la regulación de la fisión y fusión de estos orgánulos llevándolos forzosamente a un proceso de agregación.

Referencia:

Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, Lin WL, D'Alton S, Sheng H, Casey MC, Tong J, Knight J, Yu X, Rademakers R, Boylan K, Hutton M, McGowan E, Dickson DW, Lewis J, Petrucelli L. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. J Neurosci. 2010 Aug 11;30(32):15851-9.

LAS GRANDES PROLONGACIONES DE POLIGLUTAMINAS EN EL GEN DE LA ATAXINA-2 AUMENTAN EL RIESGO DE PADECER ELA.

El grupo de investigadores del departamento de biología celular y del desarrollo en la Universidad de Pensilvania en Filadelfia (EEUU) han encontrado puntos en común entre dos patologías neurodegenerativas distintas y las proteínas que las causan, la esclerosis lateral amiotrófica y la ataxia espinocerebelosa (AEC). Ambas, al parecer, implican a TDP-43, asociada con la ELA, y la ataxina-2, relacionada con la AEC. Se ha estudiado un tramo anormal de repeticiones de poliglutamina en la ataxina-2. Los científicos informaron que esta extensión de poliglutamina en la ataxina-2 aumenta el riesgo de una persona a padecer ELA. Es bien sabido que las extensiones de longitud media-larga de poliglutamina en ataxina-2 llevan a un desarrollo de AEC tipo 2, mientras que las repeticiones de corta longitud son inofensivas.

"Empezamos a estudiar desde la levadura, para encontrar un nuevo factor de riesgo genético para la ELA", comentó el responsable del proyecto, Aaron Gitler. "Realmente, realza el poder de estos modelos simples para el estudio de

patologías humanas". En su laboratorio se inició el estudio en levadura y más tarde se unieron al proyecto Nancy Bonini con su equipo, por sus conocimientos en la mosca de la fruta, John Trojanowski y Virginia Lee por sus colecciones de muestras de tejido humano.

Tanto la TDP-43 como la ataxina-2 son proteínas de unión a ARN con funciones no del todo claras. Las patologías asociadas a TDP-43, donde la proteína, que es de localización nuclear normalmente, se mueve al citoplasma y forma agregados, común en la ELA, la DFT y la enfermedad de Alzheimer. Respecto a la Ataxina-2 es uno de los numerosos genes que, cuando se alteran, causan AEC. Normalmente la proteína lleva una extensión de 22 o 23 glutaminas. Si ese número supera 34, se desarrolla AEC. Ahora, se propone que 27-33 glutaminas, predisponen a una persona a desarrollar ELA. "No estamos diciendo que estas expansiones causen la enfermedad, sino que es un factor de riesgo a tener en cuenta", han señalado los autores.

El grupo de Gitler trabaja con un modelo de levadura para proteinopatías de TDP-43. Examinaron 5.500 genes de levadura, de una biblioteca de sobreexpresión, en busca de candidatos que suprimen o aumenten la toxicidad de TDP-43. De los 40 posibles aspirantes, uno planteó verdadero interés. La proteína de unión a Pab1 de levadura, o Pbp1 (un homólogo de la ataxina humana tipo 2) aumentó la toxicidad de TDP-43. Además, si los investigadores eliminan Pbp1 de la levadura TDP-43, la levadura sana, sugiriendo que Pbp1 es esencial para la toxicidad de TDP-43. Las levaduras, por supuesto, carecen de un sistema nervioso, por lo que Gitler quería probar la interacción ataxina-2/TDP-43 en un sistema simple, pero de un organismo superior. Su colaboradora, Nancy Bonini, obtuvo un modelo de mosca de la fruta que sobreexpresa TDP-43 exhibiendo degeneración de motoneurona y otra línea de *Drosophila*, en el que esta vez, fuera el gen ataxina-2 el que se sobreexpresara. Cruzaron los dos tipos de mosca y los investigadores encontraron que, como en la levadura, la ataxina 2 extra aumentó la gravedad de la enfermedad en las moscas con sobreexpresión de TDP-43. "Esto significa que esta interacción afecta al sistema nervioso", dijo Gitler.

¿Y qué pasa en mamíferos? Los investigadores examinaron TDP-43 y ataxina-2, en el contexto de las células de riñón embrionarias humanas, mostrando por co-inmunoprecipitación, que efectivamente ataxina-2 y TDP-43 interactúan. Sin embargo, ese enlace depende del ARN. Cuando mutaron el dominio de unión entre ARN

y TDP-43, ya no unió ataxina-2. Los autores sugieren que una molécula de ARN desconocida haría de puente entre las dos proteínas, o que el ARN puede hacer que TDP-43 una ataxina-2. Finalmente, los investigadores acudieron a Trojanowski y Lee para examinar muestras de tejido humano. Tiñeron la ataxina-2 en las neuronas de la médula espinal de personas que fallecieron por ELA y otras causas. Mientras que la proteína está normalmente difusa en el citoplasma, en casos de ELA formó agregados citoplasmáticos anormales. Estos no colocalizaban necesariamente con TDP-43.

Se planteó la hipótesis de que, puesto que ataxina-2 es una proteína que contiene poliglutamina, la longitud de la región de poliglutamina podría ser importante e intervenir en la ELA. Por lo tanto recolectaron muestras de ADN de 915 personas con ELA y 980 controles sanos para medir la longitud de las colas de poliglutamina en la ataxina-2.

Gitler descubrió que casi un 5 por ciento de los casos de ELA presentaban más glutamina en ataxina-2 (27-33) de la normal (22 ó 23). En menos de un 1% de los casos control había tantas, mientras que las repeticiones de glutamina por encima de 31, se encontraron sólo en personas que tenían ELA.

Los investigadores proponen que la ataxina-2 es de algún modo necesaria para la toxicidad de TDP-43. "Tal vez - reflexionaba Gitler- la longitud intermedia de ataxina-2 es difícil de degradar por la célula, por lo que el sistema falla y se secuestra TDP-43 en el citoplasma". "La identificación de una asociación entre ataxina-2 y ELA también proporciona pruebas adicionales donde se altera el procesamiento de ARN, lo que puede ser fundamental para este trastorno", escriben Clotilde Lagier-Tourenne y Don Cleveland de la Universidad de California en un comentario que acompaña al documento en la misma edición de la revista *Nature*.

"Si TDP-43 y ataxina-2 causan problemas, la estrategia a seguir a continuación sería interferir con la reacción entre ellas como terapia para la ELA", sugirió Gitler. "Sin embargo, podría ser difícil para un fármaco que sólo detecte la forma intermedia de poliglutamina en la ataxina-2", señaló Leonard Petrucelli, de la clínica mayo en Jacksonville, Florida, quien no estaba implicado en el estudio.

El documento plantea algunas lagunas adicionales a los científicos acerca de la actividad tóxica de TDP-43. Los últimos modelos animales, que carecen de las famosas inclusiones citoplasmáticas de TDP-43 que se observan en la enfer-

medad humana, pero enferman igualmente, aun con TDP-43 en el núcleo, sugieren que, ya que la ataxina-2 es citoplásmica, es allí donde, de alguna manera se desarrollan los acontecimientos tóxicos.

Además, a Petrucelli le intriga que el dominio de ARN de TDP-43 sea necesario para la unión con la ataxina-2 causando la patología. El trabajo en su laboratorio indica que TDP-43 es fragmentada en el citoplasma, donde los fragmentos carboxilo terminal causan la mayoría de los estragos. Pero la proteína tendría que ser de longitud completa, estar íntegra o al menos no muy degradada para poder enlazar ARN, dijo.

“Independientemente de las especies o de que esté íntegra o fragmentada, es la TDP-43 citoplasmática la que es tóxica”, concluyó Petrucelli.

Aunque la AEC y la ELA son enfermedades distintas, existen casos clínicos ocasionales que presentan las dos. Trojanowski y sus colegas examinaron el tejido de la médula espinal de dos personas que tenían AEC causada por una mutación en ataxina-2 y encontraron TDP-43 deslocalizada. “Tal vez estas dos enfermedades no sean tan diferentes después de todo”, dijo Gitler. Él y sus coautores sugieren que la patología por ataxina-2 con extensiones largas de poliglutamina, está más inclinada hacia patologías espinocerebelosas y las de repeticiones medias señalan más hacia enfermedades de neurona motora espinal inferior.

Esto podría ser sólo la punta del iceberg para la ataxina-2, que podría contribuir a la patogénesis de muchas otras enfermedades que implican a TDP-43. Ya se han examinado dos casos de demencia frontotemporal lobar con inclusiones de ataxina-2 que aparecen junto con TDP-43.

“Ahora - señaló Gitler -, estamos buscando pruebas de la participación de ataxina-2 en la enfermedad de Parkinson y también examinamos otras proteínas con poliglutamina en ELA”. Gitler también está probando si FUS (otra proteína de unión a ARN que, cuando muta, causa ELA) interacciona con ataxina-2.

Referencias:

Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin A, Johnson BS, Fang X, Armakola M, Geser F, Greene R, Lu MM, Padmanabhan A, Clay-Falcone D, McCluskey L, Elman L, Juhr D, Gruber PJ, Rb U, Auburger G, Trojanowski JQ, Lee VMY, Van Deerlin VM, Bonini NM, Gitler AD. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*. 2010 Aug 26;466:1069-75.
Lagier-Tourenne C, Cleveland DW. An expansion in ALS genetics. *Nature*. 2010 Aug 26;466:1052-3.

CÓMO AYUDAN LOS MODELOS ANIMALES EN LA LUCHA CONTRA LA ELA.

Los modelos animales deben ser cuidadosamente examinados o los resultados de la investigación pueden ser engañosos y no tener aplicación en los seres humanos. Hace poco se ha discutido sobre el estado actual de los modelos animales en la investigación de la ELA, la posibilidad de conseguir nuevos modelos de ratón y el valor del modelo más usado en la investigación de esta enfermedad, el ratón SOD1.

Estos animales son usados en pruebas de nuevos medicamentos (ensayos preclínicos), lo que permite a los investigadores evaluar cómo las células y los tejidos del cuerpo interactúan con un fármaco, o determinar si un medicamento tiene efecto contra alguno de los fenómenos que causan la enfermedad. Los investigadores también estudian modelos animales para comprender mejor como se inicia una enfermedad y cuál es su progresión.

Algunos de los modelos animales más comunes incluyen invertebrados como gusanos y moscas; roedores, entre los que se incluyen los ratones, las ratas, los conejillos de indias y los conejos; y grandes vertebrados como los perros, los caballos, los cerdos y las aves. En último lugar se encontrarían los primates no humanos como los monos y los chimpancés.

Los investigadores normalmente seleccionan un modelo basado en el costo y aplicación para el problema que están tratando de resolver, evaluando parámetros tales como el tamaño, cuidados, riesgo y parecido a la fisiología humana.

El modelo animal de ELA más común, es el que los investigadores asociaron con el gen SOD1 humano, que se había encontrado mutado en algunas formas familiares de ELA. Cuando ese gen está mutado, conduce a la producción de proteína SOD1 con errores y – después de una cascada de eventos que no se comprenden aún en profundidad – las neuronas motoras degeneran y mueren.

Un gran número de modelos animales de ELA se basan en la modificación del gen SOD1, incluyendo algunos peces cebra, moscas y gusanos. Aunque valiosos, estos modelos imitan algunos aspectos de la enfermedad pero no la reproducen con exactitud absoluta.

Por ejemplo, para probar el potencial terapéutico de un fármaco diseñado para afectar al crecimiento axonal, un investigador puede utilizar un modelo de pez cebra, si sólo quiere mirar los axones. Pero si desea ver cómo su medicamento afecta a las células inmunológicas y el efecto que

esto tiene en los axones, no puede utilizar el pez. Tendría que mirar algo parecido a un ratón. Los ratones tienen sistemas complejos, similares a los de los seres humanos, incluyendo un sistema inmunitario, flujo vascular y neuronas que están rodeadas por células de soporte específico como son los astrocitos y la microglía.

El modelo más usado para el estudio de la ELA es el ratón SOD1 o SOD1-G93A, que contiene de 23 a 25 copias del gen defectuoso de la SOD1 humana con la mutación G93A (sustitución de la glicina que hay normalmente en la posición 93 de la proteína, por una alanina) encontrada en ELA familiar. Este ratón desarrolla una enfermedad que reproduce lo que correspondería con una forma agresiva de ELA, muriendo los animales portadores del transgén a los 135 días aproximadamente (en contraposición a los normales, que viven 2 años) después de producirse la pérdida de motoneuronas y la consecuente atrofia muscular. Como los humanos que padecen ELA, los ratones SOD1 experimentan pérdida muscular funcional, dificultad respiratoria, pérdida de motoneuronas superior e inferior, afectación del sistema inmunitario, interrupción de la barrera hematoencefálica, aparición de cuerpos de inclusión y agregación de proteínas (ambos hallados en el interior de las neuronas) y retracción de la unión neuromuscular. Aunque el ratón SOD1 proporciona una ventaja enorme sobre otros modelos, lo cierto es que no es un ser humano y hay diferencias importantes. ¿Es el ratón SOD1 un buen modelo para la ELA esporádica?

En primer lugar, debemos situarnos en el grado de implicación patológica de la SOD1 en el ser humano. La forma mutada de la SOD1 es responsable tan sólo de aproximadamente el 15 al 25 por ciento de los casos familiares de ELA. A pesar de que cerca del 90 al 95 por ciento de los casos humanos de ELA se consideran esporádicos (no heredados), es importante recordar que la ELA familiar y esporádica se presentan siempre clínicamente idénticas. Un médico no puede señalar la diferencia entre la ELA familiar y esporádica sin haber tenido en cuenta los antecedentes familiares y la confirmación mediante una prueba genética. Ambas formas presentan los mismos síntomas físicos y biológicos.

Hace pocos años, los investigadores realizaron una serie de pruebas para determinar el perfil de expresión del genoma completo en el ratón SOD1. Se analizaron los 30.000 genes del genoma del ratón y se estudiaron cómo se ven afectados los genes de los ratones SOD1 en comparación con los ratones sanos. La incapacidad para controlar el sistema cuidadosamente

— por ejemplo, asegurándose de que los grupos de prueba y control tienen un número igual de ratones machos y hembras, así como un número igual de la misma camada — puede conducir a falsos positivos o falsos negativos en las pruebas. Se utilizó un diseño optimizado de dicho estudio para probar una serie de medicamentos que previamente habían mostrado resultados positivos en los estudios de ratón en otros laboratorios, pero que no habían dado los resultados esperados en posteriores ensayos clínicos en humanos. Los resultados reflejaron esos fallos y fracasos en las pruebas humanas.

TDP43: Un nuevo ratón en el punto de mira de todos: pacientes, investigadores, clínicos y empresas. La forma mutante de la proteína TDP43 se ha asociado con formas tanto esporádicas como con casos familiares de ELA. Ahora existen varios modelos de ratón diseñado para expresar el gen defectuoso de TDP43. Actualmente se está trabajando para construir una colonia de los nuevos ratones TDP43 para que los investigadores los caractericen completamente, utilizando el perfil de expresión génica como lo hicieron con el ratón SOD1, para determinar cuál es la mejor manera de utilizar este nuevo ratón en los estudios. Por último, hay grupos de investigadores que trabajan en modelos de ratón FUS, otro gen que recientemente ha sido implicado en la ELA familiar y esporádica, esperemos disponer de estos modelos y, por tanto, tener la capacidad de realizar pruebas en varios modelos y así poder acercarnos mucho más a la realidad etiopatogénica de la ELA en el ser humano.

Referencia:

MDA/ALS news magazine vol.15 no.5

Escrito por los investigadores de ALS-TDI en Massachusetts (Vieira et al.)

MICROARRAYS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES EN ELA

Los avances en genómica y proteómica permiten la rápida identificación de genes relacionados con enfermedades y proteínas defectuosas. Sin embargo, surgen problemas, incluyendo las diferencias biológicas entre modelos animales y enfermedades humanas, la alta discordancia entre los datos de expresión de ADN y la proteína en cuestión y la falta de modelos experimentales para el estudio de enfermedades complejas humanas. Para superar algunas de estas limitaciones,

un equipo de investigadores estadounidenses ha desarrollado un modelo integrador usando modelos animales, material humano y una combinación de métodos de alto rendimiento (mediante el uso de microchips biológicos) para identificar nuevos marcadores moleculares de esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Utilizan microdissecciones con láser junto con microarrays para identificar cambios del transcrito que se producen en las neuronas motoras de la médula espinal o en las que las rodean, las células gliales.

Se usan dos modelos de ratones transgénicos que desarrollan patología de neurona motora, SOD1G93A y TAUP301L. Los cambios en la expresión de los genes identificados eran, en gran parte, específicos del modelo. Sin embargo, varios genes cambian con el mismo patrón en ambos modelos. La categorización como biomarcadores clínicos fue probada en el transcrito de la sangre periférica de estos animales utilizando microarrays de diseño específico para la ELA. Para confirmar la pertinencia de los genes identificados para la ELA esporádica humana, las proteínas correspondientes seleccionadas a través de sus genes, fueron examinadas por inmunoensayos de alto rendimiento utilizando micromatrices tisulares construidas a partir de tejido humano obtenido postmortem, de la médula espinal. Los genes que fueron identificados por estos experimentos y situados dentro de una región vinculada con la ELA familiar y la demencia frontotemporal, fueron secuenciados en varias familias.

Así, se han identificado varias proteínas nuevas relacionadas con la ELA esporádica (CNGA3, CRB1, OTUB2, MMP14, SLK, DDX58, RSPO2) y posibles biomarcadores en sangre, incluyendo los genes Nefh, Prph y Mgll. Ahora deberán continuar los estudios para confirmar su implicación en la población humana.

Referencia:

Kudo LC, Parfenova L, Vi N, Lau K, Pomakian J, Valdmanis P, Rouleau GA, Vinters HV, Wiedau-Pazos M, Karsten SL. Integrative gene-tissue microarray-based approach for identification of human disease biomarkers: application to amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet. 2010 Aug 15;19(16):3233-53. Epub 2010 Jun 8. Department of Neurology, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA 90095, USA.

NEUROTECH PHARMACEUTICALS ANUNCIA EL INICIO DE LA FASE 1 DEL ENSAYO CLÍNICO PARA AAD-2004, UNA MOLÉCULA ORIENTADA A LAS ENFERMEDADES DE ALZHEIMER, PARKINSON Y ELA.

Neurotech Pharmaceuticals ha comenzado las pruebas de fase 1 con AAD-2004. Esta molécula fue desarrollada como un fármaco de doble función para disminuir tanto el nivel de radicales libres como de PGE2, mediadores claves para las lesiones nerviosas en la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). El ensayo clínico de fase 1 (ensayo de toxicidad) se inició para evaluar la seguridad, la tolerancia y la farmacocinética de AAD-2004 en voluntarios sanos en abril de 2010. Las dos primeras cohortes del estudio clínico se han completado correctamente sin adversidades graves. Sobre la acción de AAD-2004 sobre los radicales libres y la inflamación mediada por PGE2 se espera que desempeñe un papel central en el proceso que lleva a la neurodegeneración que ocurre en las enfermedades mencionadas.

El uso prolongado de fármacos convencionales antiinflamatorios no esteroideos (AINES) ha sido limitado por el riesgo de infarto cardiovascular y trombosis, así como complicaciones gastrointestinales. Actualmente no hay ningún medicamento aprobado por la FDA para proteger a las células nerviosas contra la toxicidad de los radicales libres y la inflamación en el sistema nervioso de los pacientes con Alzheimer, EP o ELA.

Sobre AAD-2004, los científicos piensan que constituye un único agente que combina los atributos antiinflamatorios de la aspirina con una poderosa eficacia antioxidante, lo que podría suponer una eficaz modificación terapéutica en los efectos adversos de estas enfermedades, protegiendo a los nervios. AAD-2004 fue seleccionado como un candidato final basándose en la seguridad y eficacia demostrada en los estudios en modelos animales de enfermedad de Alzheimer. El fármaco mejoró la función cognitiva mucho mejor que los antioxidantes AINE, así como de la Memantina, un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer. El potencial terapéutico de AAD-2004 ha sido verificado en modelos animales de ELA, EP y depresión. Sin embargo, a diferencia de los AINE convencionales, que causan daños gástricos, AAD-2004 no produjo ninguna complicación relacionada, incluso en dosis superiores a la dosis máxima efectiva en los modelos animales.

Mientras que los AINEs causan riesgos cardiovasculares y gástricos, impidiendo la producción de prostaglandinas e inhibiendo otras, AAD-2004 evita selectivamente la producción de PGE2 como un inhibidor de la prostaglandina mPGES-1, la isomerasa que cataliza la conversión de PGH2 a PGE2, a concentraciones nanomolares, lo que explica por qué es más seguro que los AINE AAD-2004.

Además de AAD-2004, Neurotech tiene otros proyectos en marcha:

Neu2000, un antagonista selectivo de receptores NR2B y un potente antioxidante, ha sido desarrollado como un candidato de fármaco para lesiones de la médula espinal, infarto agudo de miocardio y quemaduras. Los estudios en los Estados Unidos demuestran que Neu2000 es seguro y por lo tanto puede ya iniciarse la fase 2 del estudio (ensayo de dosis) en humanos.

Por otro lado, ND-07 ha sido desarrollado para tratar enfermedades inflamatorias incluyendo pancreatitis, enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis reumatoide y está cerca del final de los estudios preclínicos (ensayos en modelos animales).

Referencias:

Neurotech Pharmaceuticals Contacts: Joon H. Cho. Director del departamento de desarrollo. SUWON, SOUTH KOREA (Marketwire - August 30, 2010) - Neurotech Pharmaceuticals Co., Ltd

PRESERVACIÓN DE LAS CÉLULAS NERVIOSAS EN ENFERMEDADES DE NEURONA MOTORA

Un equipo de investigadores, dirigido por Scott Oakes, de la Universidad de California en San Francisco, ha identificado una forma de prevenir la aparición de los síntomas, la pérdida de peso, la parálisis y extender la supervivencia de un modelo de ratón de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), proporcionando una nueva vía de investigación para el desarrollo de terapias para ésta y otras enfermedades de neurona motora (la ELA y otras enfermedades relacionadas con trastornos neurológicos que afectan a las células nerviosas que controlan los músculos voluntarios, necesarios para desarrollar actividades tales como el hablar, caminar, respirar, tragar y el movimiento selectivo general del cuerpo). Una característica clave de estas enfermedades

es que las células nerviosas afectadas (las neuronas motoras) mueren por un proceso conocido como apoptosis. Determinar si esta muerte contribuye a la enfermedad o se produce después de que los nervios han dejado de funcionar, es importante para establecer si el bloqueo de la apoptosis tendría un beneficio terapéutico. En este estudio, se ha eliminado genéticamente la activación de la vía apoptótica mitocondrial en un modelo de ratón de ELA para ver si esto preserva la viabilidad de la motoneurona y su función, evitando la aparición de los síntomas, la pérdida de peso, parálisis y la supervivencia del animal. Los resultados de este proyecto han sido muy esperanzadores. Según los autores, la inhibición de la activación de la vía apoptótica mitocondrial podría proporcionar una forma de preservar las neuronas motoras en individuos con ELA y otras enfermedades de neurona motora. Esto abre de nuevo vías terapéuticas que se deben probar en este tipo de pacientes.

Referencia:

Nichole A. Reyes, Jill K. Fisher, Kathryn Austgen, Scott Vandenberg, Eric J. Huang, and Scott A. Oakes. Blocking the mitochondrial apoptotic pathway preserves motor neuron viability and function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Journal of Clinical Investigation, 2010

QUEBEC: DESENTRAÑANDO LA FUNCIÓN DE TDP-43

El sexto simposio anual sobre la esclerosis lateral amiotrófica celebrado en Canadá está patrocinado por la Fundación André-Delambre y ahora se está convirtiendo rápidamente en una de las referencias principales en la investigación de la ELA. La reunión, celebrada los días 24 y 25 de septiembre de 2010 en la Universidad Laval en Quebec, Canadá, atrajo a 80 científicos que examinaron los últimos datos sobre los mecanismos de la enfermedad y los avances en los tratamientos y en el campo de células madre. Un tema que se destacó fue el relacionado con la proteína TDP-43. Su relevancia en la ELA es comúnmente aceptado por la comunidad, pero ¿qué hace TDP-43 realmente? Durante algún tiempo, la respuesta ha sido un vago, "algo tiene que ver con el ARN". En Quebec, los investigadores presentaron enfoques que pueden dar respuestas más concretas.

Clotilde Lagier-Tourenne de la Universidad de California, en San Diego (UCSD), se preguntó

sobre el tipo de ARN que interactúa con TDP-43. Lagier-Tourenne, que trabaja con Don Cleveland, está colaborando con la Polymenidou de Maddalini en el mismo grupo y el laboratorio de Gene Yeo, también en la UCSD. Los investigadores están utilizando una técnica relativamente nueva que se llama entrecruzamiento (cross-linking) inmunoprecipitación más secuenciación (CLIP-Seq) para identificar tales ARNm en cerebro de ratón. Tratan las muestras de cerebro del animal con moléculas que fijan y aseguran las posibles uniones establecidas entre proteínas y ARN. A continuación, con anticuerpos anti-TDP-43 obtenían aquellos ARN que habían unido TDP-43. Por último, se secuencian el ácido nucleico obtenido. Además, se propusieron secuencias específicas de nucleótidos que, por la información obtenida en los pasos anteriores, pueden reclutar TDP-43. Los científicos sospechan que la proteína está involucrada en splicing o procesado de ARN mensajero, ya que estos sitios de unión están en intrones y próximos las uniones intrón/exón. Un tema de debate en este campo es si TDP-43 normal, está relacionada con la patología de la ELA. Para comenzar a abordar esta cuestión, Lagier-Tourenne y Polymenidou, en colaboración con ISIS Pharmaceuticals Inc. en Carlsbad, California, utilizan oligonucleótidos antisentido para anular la expresión de TDP-43 en cerebros de ratón. Mediante secuenciación de ADNc, encontró cambios en la expresión de ARN mensajero y en su procesamiento, en estos animales. Los investigadores están trabajando para identificar los genes afectados por TDP-43, con la esperanza de entender cómo las mutaciones de TDP-43 causan ELA.

Mientras que el verdadero papel de TDP-43 es aún desconcertante a nivel molecular, muchos científicos están estudiando sus efectos generales en todo el organismo. Los investigadores de la ELA disponen de una gran colección de ratones modelo de TDP-43 que seguramente sea aumentada tras la reunión, ya que se mostró, en este congreso, nuevas actualizaciones de los laboratorios punteros en este campo.

Muchos investigadores han expresado TDP-43 humana en ratones bajo los promotores de PrP o Thy1, específicos del sistema nervioso. Julien, junto con su colega Vivek Swarup, tomó un rumbo diferente al clonar el gen humano completo, el promotor nativo incluido, e insertarlo en sus ratones. Además de hacer ratones que expresan TDP-43 humana, los investigadores utilizaron mutagénesis dirigida en los transgenes, para crear las mutaciones A315T y G348C, relacionadas con la enfermedad, creando líneas

adicionales de mutantes TDP-43. Los animales transgénicos expresaron TDP-43 humana a niveles bajos en todo el cuerpo, informó Julien. Tanto los animales salvajes como los mutantes "tenían aspectos bastante normales", señaló Julien. No sufren parálisis ni muerte prematura, y sus neuronas motoras permanecen intactas hasta los 10 meses, la edad media para los ratones. Se tambalean al equilibrarse en un rotarod, lo que sugiere cierta pérdida de control motor. También tienen problemas de memoria que los investigadores registran como demencia frontotemporal, otra TDP-43-proteinopatía. Los mutantes — especialmente el ratón G348C: presentaban agregación citoplasmática y ubiquitinación de TDP-43, similar a la patología humana en la ELA. "Uno de los cambios más notables en los ratones es la neuroinflamación", añadió Julien. Los animales exhiben microgliosis y astrogliosis, proporcionando una prueba más de que la ELA tiene un componente afectado del sistema inmunológico.

Sandrine Da Cruz presentó la última y más amplia información sobre animales TDP-43. Su laboratorio ha hecho animales modelo sobre-expresando FUS, otro gen vinculado a la ELA. En total, el grupo de Cleveland dispone de 36 líneas de ratón — 18 transgénicos de TDP-43 y FUS, incluidas las versiones de tipo salvaje y mutante (TDP-43 Q331K y M337V y R521C y R514G de FUS). "La buena noticia es que hay un montón de ratones", dijo Cleveland en tono de humor, "pero la mala noticia, es que hay realmente un montón de ratones!".

El grupo tomó la estrategia de trabajar con dos vertientes de transgénicos para cada gen. En algunas líneas, los investigadores expresaron la versión humana del FUS o TDP-43. En otros animales, se utiliza el promotor de PrP y flanqueado con sitios LOX, por lo que el transgen puede ser eliminado selectivamente de tipos celulares diferentes mediante Recombinasa Cre. Los ratones transgénicos TDP-43 muestran anomalías motoras e hiperactividad muscular; Los ratones FUS exhiben problemas similares, así como astrogliosis y alteraciones en el tamaño de algunos diámetros axonales.

De todos estos ratones, lamentablemente ninguno es bastante bueno para cubrir el ideal que los científicos están buscando, pero sin duda, son una poderosa herramienta que ayuda a dilucidar qué está pasando realmente y por qué.

QUEBEC: NEURONAS MOTORAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE

A partir de fibroblastos de la piel, con un paso intermedio de células madre, para llegar finalmente a neuronas, es una de la estrategias más actuales que mantiene la esperanza de tratar algún día la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), o al menos de ayudar a comprender mejor la enfermedad. En el simposio anual de la Fundación André Delambre, celebrado los días 24 y 25 de septiembre de 2010 en la ciudad de Quebec - Canadá, varios investigadores informaron del progreso hacia ese objetivo, aún lejano. Los investigadores utilizan células madre embrionarias, así como células pluripotentes inducidas (iPS), para hacer neuronas motoras y estudiarlas en cultivo. Algunos están utilizando esta tecnología de obtener neuronas motoras para examinar la cuestión clave de que tipos de células fallan y causan realmente la ELA. Otros están aplicando estas herramientas para entender por qué las neuronas motoras en particular son susceptibles a la degeneración. Otra cuestión es qué tipos de neuronas motoras están en mayor peligro. Victor Rafuse de la Universidad de Dalhousie, en Halifax, Canadá, presentó datos sobre neuronas motoras que son susceptibles a fatigar rápidamente versus neuronas resistentes, de fatiga lenta. Los resultados hasta la fecha sugieren que cuando se fabrican neuronas motoras a partir de células madre, las neuronas resultantes son más parecidas a las neuronas motoras resistentes — las que tienen menos probabilidades de degenerar en ELA. Una de las principales noticias del simposio, fue que Kevin Eggan de la Universidad de Harvard, anunció que sus líneas de células iPS están disponibles. Ha conseguido variedades mutantes SOD1 y TDP-43, de las que se esperan apasionantes investigaciones y resultados en el futuro. En la ELA, el tipo celular más afectado son las neuronas motoras, que terminan muriendo, pero estudios en algunos sistemas modelo sugieren que las células de la glía instigan la enfermedad de modo que dejaría de ser autónomo el efecto de las neuronas motoras. Según esto, una posibilidad de tratamiento sería reemplazar microglía endógena y perjudicial, por células nuevas que no tengan mutaciones. Nicolás Maragakis de la escuela de Medicina Johns Hopkins en Baltimore, Maryland, está trabajando en el trasplante de precursores de células gliales (GRPs) en roedores. En Quebec, Maragakis informó que está teniendo algunos problemas con el funcionamiento de las GRPs humanas en cuanto

a la diferenciación de los precursores a células gliales y a la extensión de las mismas más allá del sitio de inyección. A pesar de los problemas, sugirió que el trasplante de GRPs en animales de genotipos diferentes puede ser útil en el laboratorio para comprender cómo tipos diferentes de células interactúan en la enfermedad. Gran parte del trabajo de Maragakis fue desarrollado por Angelo Lepore, que trabajó con GRPs derivadas de fibroblastos de ratones que albergan una mutación vinculada a la ELA en la superóxido dismutasa 1 (SOD1). Inyectaba los precursores en el cerebro de los animales, donde la mayoría de los GRPs se convierten en astrocitos. La desventaja, dijo, es que el tipo de célula inyectada es inmadura y no necesariamente se integrará en la red neuronal nativa. Los investigadores observan los animales trasplantados durante meses. Es a partir del tercer mes cuando se observan inclusiones de proteínas ubiquitinadas, pérdida de neuronas motoras y dificultad motora en los animales que reciben mSOD1 GRPs (GRPs con la versión mutada de la SOD1).

Por otro lado, Eggan presentó estudios preliminares que pueden ayudar a los científicos a comprender las contribuciones relativas de las neuronas motoras y astrocitos en ELA. Evangelos Kiskinis y Sophie DeBoer están trabajando con microscopía para examinar cómo las neuronas motoras derivadas de células madre sobreviven en presencia de astrocitos de tipo salvaje o mSOD1. Cuando las neuronas motoras se rodean de astrocitos normales, aquellas extienden una densa red en el transcurso de dos semanas. Cuando se revisten de astrocitos mSOD1, las neuronas motoras se comportan, inicialmente, de igual manera. Pero al cabo de una semana se inactivaron y murieron.

Otra cuestión central en la investigación de la ELA es por qué las neuronas motoras, de entre todas las células que podrían verse afectadas, son las que se afectan. Christopher Henderson de la Universidad de Columbia en Nueva York está interesado en cómo las neuronas motoras responden a toxinas ambientales tales como los organofosforados. Utilizado disolventes, plastificantes, lubricantes y fertilizantes organofosforados, han sugerido que son una posible explicación de las altas tasas de ELA entre los trabajadores agrícolas y los veteranos de la guerra del Golfo. Usando neuronas derivadas de células madre embrionarias, él y su colega Prissette Marine vieron que las neuronas motoras tienen más probabilidades de morir con tratamientos organofosforados que otros tipos de neuronas.

Las neuronas motoras obtenidas a partir de células embrionarias, ES, o células inducidas, iPS, tienen muchas ventajas, incluyendo la capacidad para crear líneas específicas de cada paciente que llevan mutaciones humanas asociadas a la ELA, pero no está claro si las células cultivadas son muy similares a las neuronas motoras que mueren por la enfermedad. Las neuronas motoras, señaló, son heterogéneas. Algunas se fatigan rápidamente — tales como las pequeñas neuronas motoras que inervan los músculos del brazo y otras son resistentes a la fatiga — por ejemplo, las que controlan los músculos del cuello que sostienen la cabeza a lo largo de todo el día. Las resistentes son menos susceptibles a la enfermedad.

El truco más común que usan los investigadores para convertir células madre en neuronas motoras consiste en añadir, entre otros, ácido retinoico y reguladores del desarrollo celular. Rafuse encontró que la mayoría de las neuronas motoras obtenidas mediante estos protocolos expresan el marcador de neurona resistente a la fatiga, Lhx3, y no el marcador de fatiga rápida, Lim1. La labor de Sam Pfaff en el Instituto Salk de La Jolla, California, sugiere que, cuando se inyectan en los animales, las neuronas motoras derivadas de células madre crecen hacia músculos posturales resistentes a la fatiga. Más aún, incluso ocurre la transformación de algunos músculos de fatiga rápida en músculos resistentes a la fatiga.

En otras palabras, las neuronas motoras derivadas de células madre que están estudiando los científicos pueden ser aquellas que son menos susceptibles a la degeneración en la ELA. "Este trabajo tiene importantes implicaciones para el campo, y hay que replantearse estudios anteriores, usando esta tecnología", comentó Vande Velde.

Todos estos trabajos sugieren que los científicos, en el futuro, podrán establecer protocolos para convertir las células madre en neuronas motoras resistentes para reemplazar las susceptibles o afectadas por la patología de ELA.

PERSPECTIVAS INTERNACIONALES SOBRE PRACTICA ASISTENCIAL

En el 21 th Symposium Internacional de ELA, se ha tratado por primera vez los CUIDADOS PALIATIVOS como una atención prioritaria y fundamental. Se han presentado estudios relacionados con este área los días 9 de diciembre en la reunión de la

Alianza, 10 de diciembre en el Forum de profesionales competentes (logopedas, fisioterapeutas, terapeutas ocupacionales, enfermeros, psicólogos) y 11-12 de diciembre en la Reunión Científica, donde se expusieron resultados de investigación en Cuidados Paliativos.

Algunos estudios presentados han coincidido en la importancia de contar con un médico en Cuidados Paliativos como parte de la Unidad de Atención Multidisciplinar en ELA, promoviendo un trabajo en equipo, utilizando un lenguaje común, asumiendo y conociendo el manejo óptimo de la ELA, con un control eficaz de los síntomas y respeto de la autonomía del paciente. Esto podría representar una diferencia significativa para los pacientes y sus familias.

Sin embargo, se ha comprobado que aún existen muchas deficiencias, siendo una de ellas que este cuidado sólo ocurre en la fase terminal de la enfermedad. Los pacientes con ELA viven una "larga etapa" preterminal, de entre 6 meses a 3 años. Durante este período van apareciendo todos los síntomas, de forma que los pacientes y sus familiares se enfrentan a una nueva realidad. Por ello, es necesaria la identificación de las preocupaciones acerca de los síntomas y posibles escenarios de miedo antes de que ocurra una crisis. Una adecuada introducción del concepto de Cuidados Paliativos poco después del diagnóstico, de manera suave, con un enfoque de esperanza y demostrando que estos cuidados podrían resolver cualquier situación difícil, urgente y vital, se pueden convertir en una intervención positiva, que mejoraría la calidad de vida de los pacientes.

Un estudio presentado por profesionales irlandeses e ingleses, que también observó que los especialistas en Cuidados Paliativos sólo intervienen en la fase terminal de la enfermedad, propuso un modelo flexible de "consultas paliativas". Este programa tiene como objetivo, a través de un software interactivo basado en la evidencia para el tratamiento sintomático, ser una ayuda para la adopción de decisiones en los diferentes estadios de la enfermedad de motoneurona.

El software es fácil de usar, tiene una serie de menús desplegados y aporta recomendaciones basadas en la evidencia en función de la gravedad de los siguientes síntomas: disnea, disfagia, disartria, sialorrea, afeción seudobulbar, fatiga, déficit cognitivo y del comportamiento, dolor musculoesquelético, disturbio del sueño, debilidad muscular, deterioro funcional, trastornos psicológicos y decisiones al final de la vida. El programa

propuesto y preparado de acuerdo a la severidad de los síntomas, está dirigido a servicios especializados en paliativos.

Intentando incluir enfoques de la atención paliativa en el manejo de pacientes con ELA, Barbara Segal, profesora adjunta de la Escuela Universitaria de Enfermería en Vermont, EEUU, puso en marcha un estudio que consistió en incluir dentro de un equipo multidisciplinar de ELA a un especialista en medicina paliativa durante dos años. El objetivo era que el equipo alcanzase una mejor comprensión de la filosofía paliativa y conseguir una mayor continuidad en la atención sociosanitaria del paciente

Los resultados de este estudio mostraron un mayor conocimiento por parte de ambos equipos. La unión de estos equipos profesionales, hace que el paciente con ELA asuma con más seguridad las ventajas del ingreso en un HOSPICE (centro de atención sociosanitaria similar a una residencia con cuidados especializados).

La Asociación de ELA Australiana, ha realizado un estudio basado en una búsqueda exhaustiva bibliográfica y entrevistas a pacientes con ELA, cuidadores y profesionales que trabajan en Cuidados Paliativos. Han concluido que los pacientes se mostraban reacios a acceder a los servicios de Cuidados Paliativos, pues no entienden el papel de dichos cuidados en su enfermedad, ya que esta disciplina se asocia al cuidado de pacientes oncológicos en fase terminal y los enfermos de ELA no se sienten pacientes terminales. Existe por lo tanto un problema de información respecto a la enfermedad y los Cuidados Paliativos.

Los profesionales que se preocupan por conocer la expectativa de los pacientes, se muestran más afectuosos y proporcionan información más abundante o al menos más eficiente. La efectividad aumenta cuando la comunicación es clara, bidireccional, comprensible y ordenada, siendo pues vital asegurarse de que el paciente ha entendido y asimilado correctamente todo lo que conlleva el tratamiento a lo largo de su enfermedad.

Por otro lado, los pacientes percibían que los profesionales de Cuidados Paliativos no tenían muy claro el papel y la responsabilidad respecto a su atención, y se negaban a ser tratados por ellos. Asimismo los profesionales de Cuidados Paliativos se mostraban también resistentes a aceptar a estos pacientes, identificándose en el estudio que los profesionales de Cuidados Paliativos tenían escaso conocimiento y comprensión en ELA, lo que dificultaba proporcionar un estándar alto en la atención a los pacientes y sus familias.

Otro hallazgo destacado del estudio australiano es la idea ERRÓNEA de que una vez que la persona es derivada al servicio de Cuidados Paliativos, es este quien tiene la responsabilidad absoluta de su cuidado. Los estándares de calidad en la atención de un paciente con ELA, indican que durante toda su enfermedad, va a pasar por diferentes fases y va a ser tratado por diferentes integrantes de un equipo multidisciplinar e interdisciplinar, cada uno haciéndose cargo de la atención correspondiente y de forma continuada, controlando síntomas, dando soporte emocional, atención social, rehabilitación física, acompañamiento, etc.; centrándose en paliar o aliviar los efectos de la misma.

Los grupos estudiados tanto de pacientes como de cuidadores, tuvieron resultados pobres en calidad de vida y ha evidenciado que las personas que sufren trastornos neurodegenerativos y sus cuidadores tienen muchas necesidades de atención insatisfechas. Las conclusiones del estudio, indican la necesidad imperiosa de formar a los profesionales de atención paliativa en el manejo de los síntomas en la ELA, para garantizar una atención adecuada. La formación en los profesionales va a producir una intervención más efectiva, conllevando por supuesto un cambio en el comportamiento de los profesionales sanitarios y en la organización de su trabajo.

Con los resultados de la primera fase del estudio global Australiano, y con el objetivo de mejorar la atención especializada y en el momento requerido, se realizó el siguiente proyecto que consistió en tres estadios:

1º.- Entrevista a un grupo amplio de pacientes, cuidadores y profesionales de la salud, de varios estados de Australia, para determinar las necesidades de formación. Pidgeon (1985) ya nos decía que si se sabe cómo los sujetos conceptualizan la enfermedad, se podrá aumentar la probabilidad de implementar inmediata y efectivamente la intervención más adecuada

2º.- Desarrollo e implementación de un programa de formación piloto e integral para personas que trabajan en las áreas de Cuidados Paliativos. Los temas incluidos en este programa ofrecen información acerca de la ELA y la forma de gestionar con eficacia los problemas prácticos experimentados por los pacientes y las familias. El programa de formación consistió en seis módulos de una hora cada uno. Este proyecto piloto de formación se ha impartido en toda Australia.

3º.- Evaluación de la eficacia del programa de formación impartido, con el objetivo de

mejorar la atención de las personas con ELA y sus familias. Los resultados de la formación muestran una mejora del conocimiento en la enfermedad y una actitud más positiva para atender a las personas que sufren ELA.

Con los hallazgos de este estudio y las propuestas presentadas, las personas que viven con ELA y sus familias se beneficiarán en un futuro, del mayor y mejor acceso a servicios de Cuidados Paliativos.

Otro aspecto importante encontrado en estos estudios es que la responsabilidad y el rol propio de los profesionales de la salud frente a los pacientes con ELA, no siempre está relacionado sólo con la falta de formación, ya que según la ponencia del Dr. Jackson V. del Hospital General de Massachusetts, Unidad de Cuidados Paliativos, así como en el estudio Australiano, muestran que la enfermedad provoca un fuerte impacto emocional en los profesionales. El cuidado de los pacientes con ELA, que sufren y se mueren con el tiempo, después de haberse establecido una relación empática y terapéutica, tanto con él como con su familia, es un desafío particular para los profesionales que intervienen en su cuidado.

Los estudios iniciales analizan las modalidades de la activación emocional y del control de la misma en situaciones de emergencia, como es el trabajo en determinados servicios de un Hospital (Maslach 1982). El estrés de los profesionales que trabajan con enfermos en situación terminal comenzó a ser objeto de interés y de estudio a principios de 1970 – a raíz de la instauración del movimiento de Cuidados Paliativos – identificándose entonces, elevados niveles de estrés ocupacional relacionados con: el entorno laboral, el rol ocupacional, la relación con los pacientes y sus familiares y variables relacionadas con la enfermedad (Vachon 1993).

En un estudio multicéntrico, sobre los diferentes aspectos relacionados con el estrés ocupacional, realizado con 400 profesionales sanitarios del ámbito de los Cuidados Paliativos, mostró que el 56% de los profesionales percibía un estrés emocional con intensidad leve, un 28% lo catalogaban de moderado, 9% de intenso y el 7% restante, no percibía estrés (Schroeder 1995). Después de 25 años, estos datos señalan que un elevado porcentaje de profesionales sigue sufriendo niveles de estrés de mayor o menor intensidad, cuyas consecuencias, no sólo les afectará a nivel personal (mayor coste emocional en la realización de su trabajo, desmotivación y/ o evitación del mismo) sino que también puede afectar a la calidad asistencial.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de prevenir y/ o reducir los niveles de estrés de estos profesionales, ya sea facilitándoles el entrenamiento en estrategias de afrontamiento efectivas o incorporando en su formación académica el estudio y práctica de herramientas emocionales.

Otro estudio realizado en el servicio de Neurología y Unidad de Cuidados Paliativos de la Universidad de Munich, evaluó los datos demográficos de los pacientes con ELA atendidos en esta unidad desde enero de 2007 hasta diciembre 2009, concluyendo que aunque el número de pacientes con ELA que ingresaron en la unidad de Cuidados Paliativos es relativamente bajo, el número de ingresados no ha variado a lo largo de estos tres años. Sin embargo, la duración de la hospitalización suele ser más corta y han disminuido los fallecimientos en los ingresos más graves. El estudio concluye que para los pacientes de ELA el ingreso en la Unidad de Cuidados Paliativos no se asocia con la idea de un desenlace inminente, sino que ingresaron por problemas comunes de la enfermedad, como pueden ser insuficiencia respiratoria, depresión, problemas de salivación, o por un incremento en la debilidad. La mayoría volvió a su casa, solamente dos pacientes fueron derivados a residencias.

Referencias

- Lorenzi S, Hensler M. Universidad de Munich. Departamento de Neurología y Unidad de Cuidados Paliativos. Alemania**
- Barbara Segal MS, RN. Enfermera especializada en Cuidados Paliativos, graduada en la Universidad de Boston**
- Dra. Karen Cross. Especialista en Hospice y Medicina Paliativa. Trabaja como Director Médico del Hospice y Centro de Cuidados Paliativos en Winston-Salem y Baptist Medical Center de ELA**
- Jackson V. Hospital General de Massachusetts, Departamento de Medicina, Unidad de Cuidados Paliativos, Boston USA**
- MCConigley R, Aoun S, Kristjanson L, Currow D, O'Connor M, Clyer S, Edis R, Harris R, Allcroft P, Yates P. Asociación MND - Australia. Servicios de Cuidados Paliativos de Adelaida. Universidades participantes en el estudio: Technology, Flinders, Monash, Queensland - Australia.**
- Bede P, Oliver D, O Brannagain D, Hardiman O. Trinity College, Dublin. Beaumont Hospital, Dublin. Dochas Centre, Drogheda - Irlanda. Universidad de Kent, Rochester - UK.**