

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Caracterización proteómica del plasma de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

JORGE LUIS SÁNCHEZ TORRES

DIRECTORA

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

CODIRECTORA

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ

Ciudad de México, enero de 2018.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

“Entré en la jungla del sistema nervioso ¡y quedé tan fascinado por su belleza que decidí dedicarle todo mi tiempo, mi vida!”

-Rita Levi Montalcini-

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto 262111.



Este proyecto se desarrolló en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México en colaboración con el Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, bajo la dirección de la Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez y la Dra. Petra Yescas Gómez.



POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Directora de tesis

Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Petra Yescas Gómez

Codirectora de tesis

Depto. de Neurogenética y Biología Molecular, Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

Biól. Jorge Luis Sánchez Torres

Sustentante

Lectores de tesis

Dra. Marie Catherine Boll Woehrlen (Laboratorio de Investigación Clínica, Instituto
Nacional de Neurología y Neurocirugía).

Dra. Minerva Camacho Nuez (Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de
la Ciudad de México).

Dr. Mauricio Castañón Arreola (Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma
de la Ciudad de México).

Dedicatorias

A mis padres:

Por toda su ayuda, apoyo, comprensión, pero sobre todo, por todo su amor. Porque este logro también es suyo y porque de no ser por ustedes esto jamás hubiera sido posible. No podría nombrar todas las cosas por las que estoy agradecido con ustedes porque no me alcanzaría la vida ¡Los amo!

A mis hermanos:

Por estar siempre a mi lado en todo momento, por impulsarme a seguir adelante aunque los momentos fueran difíciles y las circunstancias adversas, porque con su cariño me han enseñado a seguir y nunca rendirme.

A mis amigos:

A Jonathan, Juan y Alberto; por estar conmigo incondicionalmente, por darme ánimos para seguir cuando quería desvanecerme, por todas sus enseñanzas, pero sobre todo, por ser mi apoyo, porque me han hecho conocer la verdadera amistad.

A Mónica:

A ti, mi pelirroja hermosa... Porque fuiste una pieza fundamental en múltiples formas para este proceso. Por siempre creer en mí (aún cuando yo no lo hacía), por soportarme en mis ratos de estrés, por impulsarme a ir siempre por más y sacarme de mi zona de confort. Gracias porque en todo momento fuiste un apoyo incondicional ¡Te amo!

Agradecimientos

A mi familia: A veces tan cerca, otras tan lejos, pero siempre en mi corazón.

A la Dra. Petra Yescas Gómez: Mi más sincero y profundo agradecimiento por todo su apoyo, por nunca dudar de mis capacidades y por siempre tenderme la mano cada que necesite ayuda. Gracias por todos los conocimientos transmitidos y por la oportunidad de la estancia en Londres. Porque mientras más la conozco mi cariño y admiración hacia usted crece.

A la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez: Por toda la confianza durante mi proyecto y por aceptarme en su grupo de trabajo. Gracias por toda su ayuda y orientación. También por enseñarme que las cosas siempre se pueden mejorar aunque a menudo el proceso no sea fácil. Gracias por que en usted encontré excelencia académica y una gran calidad humana.

A la Dra. Marie Catherine Boll Woehrlen: Por todo el apoyo en la parte clínica de este proyecto y por sus observaciones siempre tan acertadas. También por siempre dibujar una sonrisa en el rostro de todo aquel que la rodea. Mi más sincero agradecimiento, respeto y admiración.

A los Drs. Mauricio Castañón Arreola, Minerva Camacho Nuez, Jonathan Puente Rivera y Alma Villalobos Osnaya: Por los comentarios y aportaciones hacia este trabajo. Por todos los conocimientos transmitidos en sus clases y por siempre tener tiempo para resolver alguna de mis múltiples dudas.

A la Dra. Nancy Monroy Jaramillo: Por todo su apoyo, consejos y por sus comentarios siempre tan acertados. Por estar al pendiente de mí y por convertirse en una mentora, pero también, por ser un ejemplo para mí en más de una forma.

A David, Mónica, Víctor, Yarely, Frederick y Diana: Porque sin su apoyo este proceso hubiera sido aún más tortuoso y aburrido. Gracias por todos los buenos momentos juntos... Siempre "los 7 de la suerte".

A Michael: Por tenderme la mano siempre que necesite ayuda, también por todos tus consejos y por esas charlas interminables. ¡Gracias Doc!

To Dr. Henry Houlden and Dr. Conceição Bettencourt: Because of all the knowledge and the beautiful experience that I lived in London. You did unforgettable and amazing my journey, thank you for made me feel at home even being away from it.

Al Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México: Por ser el escenario ideal para que todo esto se llevara a cabo y por ser como mi segundo hogar durante estos años.

To the University College London, The National Hospital for Neurology and Neurosurgery, and The Institute of Neurology: Because of the opportunity to allow me been in the United Kingdom, and owing to there I could found academic excellence and high quality research.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): Por la beca Nacional otorgada para mis estudios de maestría y por la Beca Mixta de Movilidad en el Extranjero que se me otorgó para mi estancia de investigación en Londres, Reino Unido.

Glosario

Espasticidad: Es un trastorno motor del sistema nervioso en el que algunos músculos se mantienen permanentemente contraídos. Dicha contracción provoca la rigidez y acortamiento de los músculos e interfiere sus distintos movimientos y funciones (deambulación, manipulación, equilibrio, habla, deglución, etc.).

Gliosis: Es una respuesta de las células gliales del sistema nervioso central luego de una lesión o trauma cerebral. Durante este proceso se forman cicatrices en el cerebro como resultado de la liberación de astrocitos en la parte del cerebro que ha sido lesionada o dañada.

Fasciculaciones: Son pequeñas e involuntarias contracciones musculares, visibles bajo la piel y que no producen movimiento de miembros, debidas a descargas nerviosas espontáneas en grupos de fibras musculares esqueléticas.

Hiperreflexia: Es la exaltación o aumento de los reflejos osteotendinosos, es por lo tanto el fenómeno contrario a la disminución de los mismos que se denomina hiporreflexia. Puede estar ocasionada por diversas enfermedades, una de las más frecuentes es la lesión de la vía piramidal.

Anartria: Es un tipo de trastorno del lenguaje caracterizado por la imposibilidad de articular los sonidos. La persona afectada comprende lo que se le dice, lo puede leer, pero le resulta imposible pronunciar la palabra que lee. La anartria está causada por una lesión cerebral focal localizada en el núcleo lenticular.

Sialorrea: También conocida como ptialismo o hipersalivación y se caracteriza por la producción excesiva de saliva o flujo salival. Se sugiere definirlo como una exacerbación del reflejo esófago-salivar.

Afectación pseudobulbar: es un cuadro que se caracteriza por la presencia de una expresión emocional exagerada o inapropiada en relación con el contexto y que cursa típicamente con episodios de risa y de llanto

Cifosis: Incremento de la curvatura raquídea de la convexidad posterior del raquis dorsal, o aparición de una curvatura de convexidad posterior en la región lumbar o cervical.

Signo de Babinski: También conocido como reflejo plantar, sirve para conocer el grado de madurez cerebral o si existe alguna patología nerviosa, esto mediante la

estimulación de la planta del pie, viéndose reflejado en una contracción de los dedos del pie (abriéndose a manera de abanico).

Signo de Hoffman: Es un signo de afectación de la vía puramidal que se genera por afectación de extremidades superiores. Como respuesta a la estimulación se produce la flexión del dedo estimulado o de otros dedos.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Enfermedades neurodegenerativas.....	3
1.2 Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).....	4
1.2.1 Neuropatología en la ELA.....	5
1.2.2 Características clínicas de la ELA.....	7
1.3 Epidemiología de la ELA.....	11
1.4 Genética de la ELA.....	12
1.5 Neuroproteómica.....	15
1.5.1 El sistema glinfático y su efecto en el neuroproteoma.....	16
1.5.2 Proteómica de la ELA.....	16
1.6 Patogénesis de la ELA.....	17
1.7 Desregulación proteolítica en la ELA.....	21
2. Antecedentes.....	23
3. Justificación.....	27
4. Hipótesis.....	28
5. Objetivos.....	29
6. Estrategia experimental.....	30
7. Materiales y métodos.....	31
7.1 Población de estudio.....	31
7.2 Diseño del estudio.....	31
7.2.1 Criterios de inclusión de pacientes.....	31
7.2.2 Criterios de exclusión de pacientes.....	31
7.2.3 Criterios de inclusión de controles.....	32
7.2.4 Criterios de exclusión de controles.....	32
7.3 Obtención de muestras.....	32
7.4 Determinación de actividad proteolítica.....	32
7.5 Identificación de proteasas.....	33
7.6 Eliminación de proteínas abundantes.....	33
7.7 Cuantificación de proteínas.....	34
7.8 Análisis de integridad.....	34
7.9 Electroforesis bidimensional.....	36
7.9.1 Separación en primera dimensión.....	36
7.9.2 Separación en segunda dimensión.....	36
7.10 Análisis de geles.....	38
7.11 Identificación de proteínas por MALDI-MS.....	38
7.12 Análisis <i>in silico</i> de funciones biológicas.....	39
7.13 Análisis clínico-proteómico.....	39
8. Resultados.....	40
8.1 Población de estudio.....	40

8.2 Eliminación de proteínas abundantes.....	40
8.3 Integridad de proteínas.....	43
8.4 Determinación de actividad proteolítica.....	45
8.5 Electroforesis bidimensional.....	50
8.6 Identificación de proteínas por MS.....	56
8.7 Análisis in silico de funciones biológicas y categorización funcional.....	58
8.8 Características clínicas de pacientes.....	63
9. Discusión.....	68
10. Conclusiones.....	73
11. Perspectivas.....	74
12. Bibliografía.....	75
Apéndice 1.....	83
Apéndice 2.....	85

Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones para la elaboración del gel separador y concentrador.....	35
Tabla 2. Componentes del amortiguador de rehidratación para IEF de las tiras.....	37
Tabla 3. Pacientes analizados en este estudio.....	41
Tabla 4. Actividad proteolítica (MMP-9) presente en zimogramas.....	47
Tabla 5. Número de spots promedio obtenidos por grupo.....	53
Tabla 6. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas por MS.....	57
Tabla 7. Características clínicas de los pacientes analizados.....	64
Tabla 8. Proteínas involucradas en el desarrollo de la ELA.....	67

Índice de figuras

Figura 1. Hipointensidad de giro precentral en ELA.....	6
Figura 2. Signos y síntomas de disfunción de neurona motora superior y neurona motora inferior en ELA.....	8
Figura 3. Criterios de El Escorial para diagnóstico de ELA.....	10
Figura 4. Proporción de casos de ELA atribuido a cada gen.....	14
Figura 5. Procesos celulares y moleculares que participan en la neurodegeneración de la ELA.....	19
Figura 6. Zimograma de LCR y suero.....	26
Figura 7. Diagrama de flujo general de la estrategia experimental realizada.....	30
Figura 8. Eliminación de proteínas abundantes en plasma.....	42
Figura 9. Análisis de integridad de proteínas de plasma procesadas.....	44
Figura 10. Zimograma de actividad proteolítica del plasma de pacientes con ELA y control.....	46
Figura 11. Comparación de actividad proteolítica (MMP-9) en los plasmas de pacientes con ELA y controles.....	49
Figura 12. Gel 2-DE representativo de los casos analizados en este estudio.....	51
Figura 13. Análisis diferencial por PDQuest de gel 2-DE.....	52
Figura 14. Geles representativos donde se muestran los spots diferencialmente expresados entre casos y controles.....	54
Figura 15. Comparación entre perfiles proteómicos de plasmas de pacientes con ELA y controles.....	55
Figura 16. Localización celular de las proteínas identificadas por MS.....	59
Figura 17. Funciones biológicas de las proteínas identificadas por MS.....	60
Figura 18. Procesos biológicos de las proteínas identificadas por MS.....	61
Figura 19. Gráfico de correlación entre la actividad proteolítica de la MMP-9 y la ALSFRS-R.....	65
Figura 20. Gráfico de correlación entre la actividad proteolítica de la MMP-9 y el índice de Kimura.....	66

Resumen

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas motoras, conllevando a una parálisis y degeneración muscular progresiva. Actualmente la ELA se ha posicionado como la tercera enfermedad neurodegenerativa más frecuente en el mundo. El diagnóstico de ELA se realiza por las características clínicas, electromiografía, neuroimagen y genética. Sin embargo, no existen moléculas indicadoras que permitan realizar un diagnóstico asertivo y presintomático de la enfermedad. Aunado a esto, la toma de muestras implica generalmente técnicas con alto grado de invasión (como biopsias de músculo y punciones lumbares). Por lo que el abordaje proteómico a partir de muestras con un menor grado de invasión es una opción para conocer las moléculas y los mecanismos que participan en el desarrollo de la ELA. El objetivo de este trabajo fue determinar mediante análisis proteómico la expresión diferencial de proteínas en plasmas de pacientes con ELA. Para realizar esto se analizaron 20 plasmas de pacientes con diagnóstico de ELA y 20 plasmas de individuos sanos, las muestras se analizaron por 2-DE PAGE y los *spots* se analizaron mediante espectrometría de masas para posteriormente ser identificados. También, se determinó la actividad proteolítica de las MMP en plasma de pacientes y controles. En el análisis proteómico se observó en promedio 37 proteínas diferencialmente expresadas, de las cuales 14 se identificaron. De estas proteínas, la serpina-1, clusterina, ankirina-1 y la proteína asociada a núcleo accumbens han sido poco caracterizadas en la ELA. Las proteínas identificadas participan en procesos como desregulación génica, neuroinflamación, activación de la glía, desregulación de la actividad proteolítica, agregación de proteínas, detoxificación celular y metabolismo de lípidos; pudiendo contribuir así en el desarrollo de la enfermedad. Además la actividad proteolítica fue significativamente mayor en los plasmas de los pacientes con ELA con respecto a individuos sanos, encontrando que a mayor actividad proteolítica, el cuadro clínico (como evolución, funcionalidad y severidad de la enfermedad) se ve afectado de igual forma.

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by a progressive loss of motor neurons, leading to progressive paralysis and muscular degeneration. ALS has become currently as the third most frequent neurodegenerative disease around the world. The diagnosis of ALS is made by clinical characteristics, electromyography, neuroimaging and genetics. However, there are no indicator molecules that allow an assertive and presymptomatic diagnostic. In addition to this, sampling usually involves high degree invasion techniques (such as muscle biopsy and lumbar puncture). Proteomic approaches from samples with a lower invasion degree are essential to know molecules and mechanisms involved in the development of ALS. The aim of this study was to determine the differential expression of proteins in plasma of ALS patients by proteomic analysis. In this study 20 plasmas from ALS patients and 20 plasmas from healthy individuals were analyzed, the samples were analyzed by 2-DE PAGE and the peptides spots were analyzed by mass spectrometry and then identified. The proteolytic activity of MMP-9 in plasma from patients and controls was also determined by zymograms and correlated with the clinical characteristics of each patient. The proteomic analysis showed 37 differentially expressed proteins of which 14 had differential expression in all the analyzed patients, these proteins were identified. Four of these 14 proteins were serpin-1, clusterin, ankyrin-1 and the nucleus accumbens-associated protein; all proteins were poorly related in ALS cases according to the literature. Identified proteins were involved in processes such as gene deregulation, neuroinflammation, glial activation, proteolytic activity deregulation, protein aggregation, cellular detoxification and lipid metabolism; allowing in this way the development and the disease progression. In addition, a significantly higher proteolytic activity was found between the plasma from ALS patients and healthy controls, which means that the high proteolytic activity will be reflected in clinical manifestations (such as evolution, functionality and severity of the disease).

1. Introducción

1.1 Enfermedades neurodegenerativas.

La neurodegeneración es un fenómeno que ocurre en el sistema nervioso central (SNC) a través de *hallmarks* asociados a la pérdida de la estructura y función neuronal. La neurodegeneración es observada en eventos patológicos y mayoritariamente se denominan como “enfermedades neurodegenerativas” (Chen *et al.*, 2016).

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) son entidades definidas como trastornos que se caracterizan por una pérdida selectiva de neuronas las cuales comprometen sistemas funcionales definiendo una presentación clínica (Kovacs, 2014). Estos trastornos son de naturaleza multifactorial y tienen signos neuropatológicos característicos en común, así como una serie de procesos bioquímicos anormales (Cacciatore *et al.*, 2012). En las EN la patología no se extiende de un área de cerebro a las áreas vecinas. En cambio, la propagación sigue patrones específicos de la enfermedad que se asemeja a la arquitectura de las redes de conectividad cerebral (Yates, 2012). Aunque estas enfermedades presentan manifestaciones clínicas muy similares (dependiendo parcialmente de la región del cerebro que está afectada), comparten algunas características en común, presentando molecularmente los *hallmarks* de la neurodegeneración, que incluyen la formación y deposición aberrante de proteínas mal plegadas, disfunción sináptica, estrés oxidativo, procesos autofágicos deficientes, inflamación y muerte neuronal (Chiara *et al.*, 2012).

Las EN involucran también la combinación de predisposiciones genéticas y factores ambientales, desencadenando el incremento del estrés relacionado con la edad y la disfunción de la proteostasis en las neuronas afectadas (Saxena & Caroni, 2011).

Las EN son cada vez más comunes y este aumento en su incidencia se presenta como resultado del aumento de la esperanza de vida y los cambios demográficos de la población (por ejemplo, el envejecimiento), a medida que nuestra población envejece, una mejor comprensión de estas enfermedades será vital para el desarrollo de terapias más eficientes, en pro de la lucha contra los costos

personales, sociales y económicos que implican estas entidades clínicas (Skovronsky *et al.*, 2006). De este modo el conocimiento de los mecanismos a nivel molecular de estas enfermedades contribuya al desarrollo de nuevos avances terapéuticos (Nieoullon, 2011).

1.2 Esclerosis Lateral Amiotrófica

Dentro de las EN, las enfermedades de neurona motora (NM) son un grupo de trastornos heterogéneos que se caracterizan por debilidad muscular y/o parálisis espástica. El término enfermedad de NM se va a referir a entidades que resultan en una degeneración progresiva de las NM lo que conlleva a una pérdida severa de las neuronas motoras inferiores (NMI) y superiores (NMS) (Dion *et al.*, 2009; Tiriyaki & Horak, 2014).

En el año de 1869 el médico francés Jean Martin Charcot realizó la primera descripción en un grupo de pacientes con enfermedad de NM, y fue hasta el año de 1875 que acuñó el término de Esclerosis Lateral Amiotrófica (Kumar *et al.*, 2011). La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) también referida como enfermedad de neurona motora, puede ser definida como una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una debilidad muscular progresiva, la cual es debida a la pérdida de la integridad neuromuscular, en donde los nervios periféricos se acortan por la degeneración de neuronas motoras (Talbot, 2002; Silani *et al.*, 2011). Dicha parálisis progresiva conlleva a la muerte generalmente por afecciones respiratorias después de los 3-5 años de que aparecen los primeros síntomas (Al-Chalabi *et al.*, 2012). La incidencia máxima de la ELA se sitúa entre los 60 y 70 años de vida, sin embargo, actualmente se han descrito casos de inicio temprano, juveniles (Sabetelli *et al.*, 2016) e infantiles (Aggarwal & Shashiraj, 2006). La ELA debe su nombre debido a un endurecimiento de la parte anterior y lateral del tracto corticoespinal (esclerosis lateral) donde las NM de esas áreas se degeneran y son remplazadas por gliosis. Por otro lado, la amiotrofia se refiere a la atrofia de las fibras musculares, conllevando a la debilidad de los músculos afectados y a fasciculaciones. La ELA es una enfermedad progresiva e incurable, el tratamiento farmacéutico por excelencia es el Riluzole, el cual impide la estimulación de receptores glutamatérgicos incrementando la sobrevivencia de 3-5 meses (Silani *et al.*, 2011).

En la ELA existen dos formas de presentación, la forma familiar (ELA familiar), que representa entre un 5-10% de todos los casos, la cual se hereda generalmente con un patrón de herencia autosómico dominante, y por otro lado, aquellas formas en las que no se encuentra una historia familiar y a las que se presuponen un origen esporádico (ELA esporádica), siendo esta la forma más frecuente, representando entre 90-95% de los casos (Renton *et al.*, 2014).

1.2.1 Neuropatología en la ELA.

Como parte del espectro neuropatológico, en la mayoría de cerebros con ELA se observa atrofia de las raíces de nervios anteriores. En algunos casos se presenta atrofia del giro precentral (Figura 1). En pacientes con demencia, la atrofia de la corteza frontal y temporal se hace presente, y se relaciona al traslape ELA-Demencia Frontotemporal (DFT). Además de las anomalías en materia gris, la reducción en materia blanca también es observada, particularmente en el tracto corticoespinal (Saber *et al.*, 2015).

La degeneración de los sistemas de las NM superiores e inferiores es la principal característica patológica de la ELA, sin embargo, existe evidencia de que el proceso neurodegenerativo también se presenta en el sistema de neuronas no motoras, incluyendo al sistema límbico, los ganglios basales y la zona intermedia de la médula espinal (Piao *et al.*, 2003). Se presentan también una predominante degeneración y cambios en algunas áreas profundas de la materia gris como el hipocampo, la amígdala, núcleo accumbens, hipotálamo, cuerpo calloso, sustancia nigra y tracto corticoespinal (Ikemoto *et al.*, 2000).

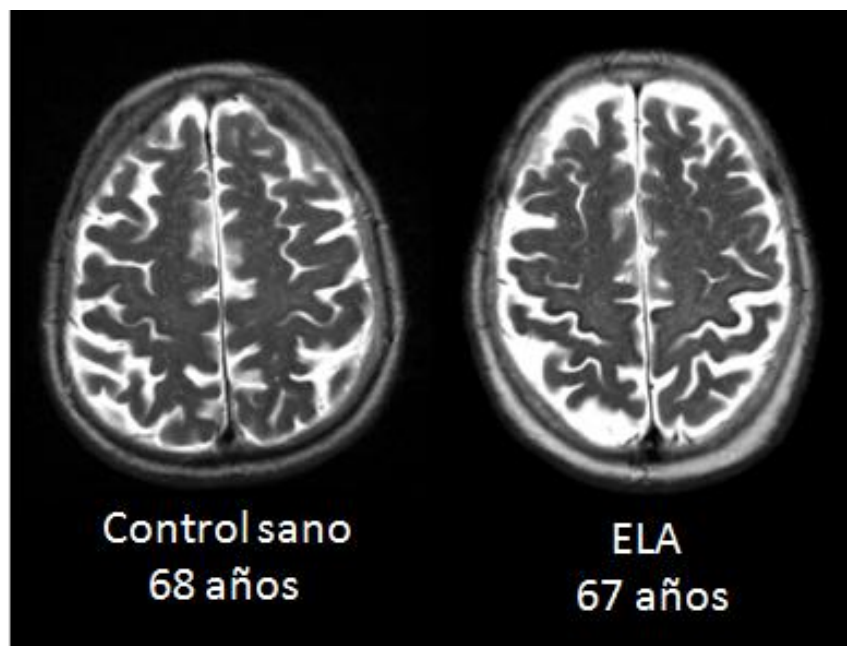


Figura 1. Hipointensidad del giro precentral en ELA. Imagen por resonancia magnética de encéfalos de un individuo sano y un paciente con ELA, ambos del sexo femenino. En la imagen del paciente se aprecia una hipointensidad significativa de la corteza motora en comparación con el control. Tomado y modificado de Cervo *et al.*, 2015.

Con respecto a la patología celular de la ELA, es de gran importancia que en esta enfermedad se hayan descrito inclusiones citoplasmáticas neuronales características (cuerpos de Bunina e inclusiones ubiquitinadas) en las neuronas motoras inferiores. En comparación con las marañas neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer, cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson, o inclusiones intranucleares neuronales en enfermedades de poliglutamina, se sabe mucho menos sobre los perfiles moleculares de las inclusiones asociadas en la ELA (Piao *et al.*, 2003).

1.2.2 Características clínicas de la ELA

La ELA afecta a las NMI de la medula y el cuerno anterior de la medula espinal, así como las NMS de la corteza cerebral. La consecuencia para los pacientes es la debilidad muscular progresiva que conduce a la muerte, por lo general de insuficiencia respiratoria. La degeneración de las NMI causa fasciculaciones, calambres, atrofia muscular y una debilidad marcada que es a menudo más problemático para los pacientes que la espasticidad, hiperreflexia y debilidad moderada asociada a pérdida de NMS (Figura 2). Los signos de Hoffman y Babinski están presentes y son también típicos de degeneración de NMS. La ELA de inicio en extremidades se presenta en al menos dos tercios de los pacientes, a menudo en brazos. Los primeros síntomas son usualmente unilaterales y focales. Los hallazgos tempranos incluyen caída del pie, dificultad para caminar, pérdida de destreza manual o dificultad para levantar los brazos sobre la cabeza (Coupé & Gordon, 2013). Finalmente, la función de la extremidad se pierde, lo que lleva a la dependencia de los cuidadores. Los pacientes pueden caer o perder la capacidad para caminar. La ELA de inicio bulbar, se presenta generalmente en personas ancianas, la cual parece tener un peor pronóstico. La disartria comienza usualmente antes que la disfagia; los síntomas pueden progresar a anartria, sialorrea y malnutrición. Una lengua fasciculante atrofiada es una característica distintiva de la ELA bulbar, que es virtualmente el diagnóstico de esta condición. La debilidad axial puede causar caída de cabeza y cifosis, característica asociada con dolor y un equilibrio deficiente. Los movimientos oculares se mantienen hasta etapas avanzadas (Knibb, *et al.*, 2016; Coupé & Gordon, 2013).

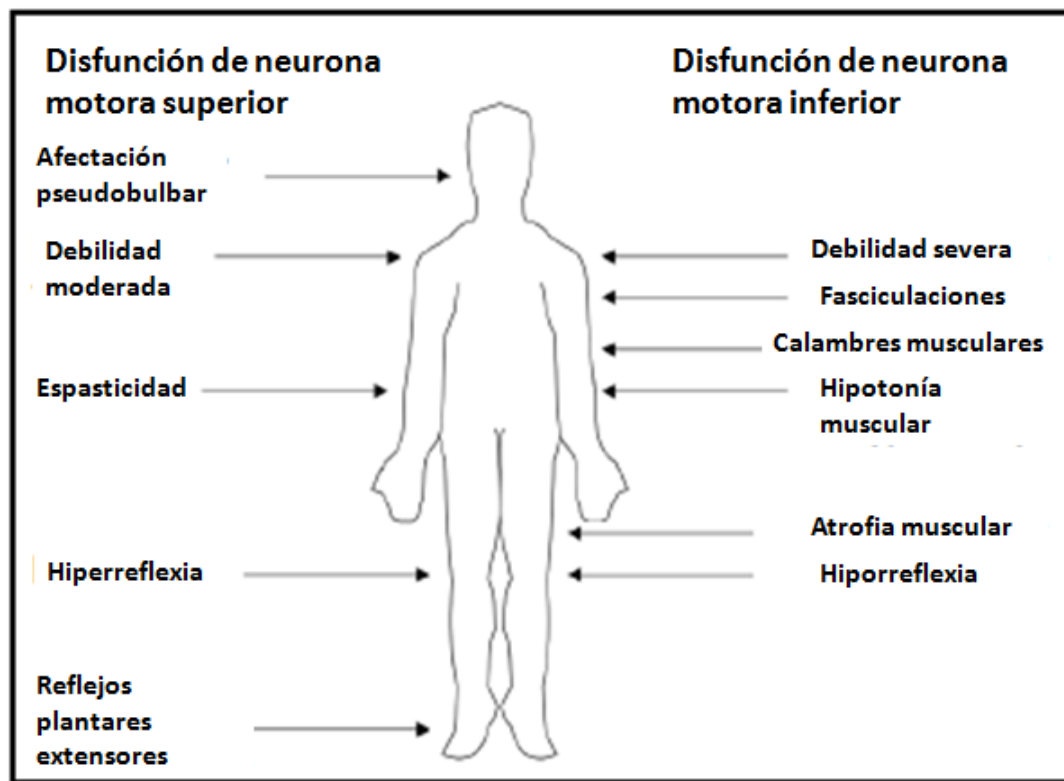


Figura 2. Signos y síntomas de disfunción de neurona motora superior y neurona motora inferior en ELA. De lado izquierdo se enlistan algunos síntomas característicos de NMS, mientras que en la columna derecha se mencionan algunos síntomas de NMI. Tomado y modificado de Sathasivam 2010.

Aproximadamente el 50% de los pacientes con ELA presentan alteraciones neuropsicológicas, que involucran al lenguaje, el juicio, la personalidad, el afecto y la disfunción en funciones ejecutivas. Los pacientes con ELA y demencia tienen una sobrevivencia más corta (entre 1 a 3 años), posiblemente como resultado de una deficiencia en memoria, juicio y raciocinio. La depresión y ansiedad pueden ocurrir en cualquier etapa. Los síntomas emocionales deterioran la calidad de vida a través de la falta de apetito, de sueño y la aparición de sentimientos de desesperanza (Raaphorst *et al.*, 2010).

La cefalea matutina, tos debilitada y disnea de esfuerzo, son los síntomas respiratorios tempranos. Más adelante, se presenta dificultad para respirar, primero al ejecutar tareas simples como vestirse y comer, finalmente también durante el reposo, conllevando a la muerte por paro respiratorio o neumonía (Reniers *et al.*, 2017).

El diagnóstico clínico de la ELA depende de los signos de NMS y NMI encontrados durante la examinación. El Escorial es un criterio que ayuda al diagnóstico clínico y a los estudios de investigación. En este criterio, los pacientes se clasifican por el número de regiones del cuerpo afectadas: bulbar, cervical, torácica o lumbar. El criterio de El Escorial fue desarrollado en 1990 y continua siendo empleado para diagnosticar y clasificar los casos de ELA como “posible,” “probable,” o “definida” (Figura 3) (Redler & Dokholyan, 2012).

Tipo de ELA	Presentación clínica
ELA Definida	Signos de NMS y NMI en tres regiones (figura izquierda)
ELA Probable	Signos de NMS y NMI en dos regiones Y Algunos signos de NMS deben ser rostrales (por encima) de los de NMI
ELA Posible	Signos de NMS y NMI en una región Ó Signos de NMS solo en dos o más regiones
Sospecha de ELA	Signos de NMI en solo dos o más regiones
Todas	Signos de degeneración propagada en o entre regiones Y Ausencia de evidencia electrofisiológica o de neuroimagen para otras enfermedades que puedan explicar la degeneración observada

NMS: Neurona motora superior
NMI: Neurona motora inferior

Figura 3. Criterios de El Escorial para el diagnóstico de ELA. Tomado y modificado de Redler & Dokholyan, 2012.

Por otro lado, la Escala Funcional de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALSFRS) y su forma revisada (ALSFRS-R) son los marcadores más amplios que permiten evaluar la progresión de la ELA en la práctica clínica y en la investigación. La ALSFRS-R muestra una fuerte correlación con la progresión de la enfermedad y la supervivencia, así como la eficacia en diversos tratamientos terapéuticos (Franchignoni *et al.*, 2013). La severidad de la enfermedad medida por la ALSFRS-R otorga una serie de puntajes (*scores*), los cuales se obtienen a partir de 12 preguntas que implican una tarea, cada una. Cada tarea se clasifica en una escala de cinco puntos, de 0= no se puede hacer, y 4= habilidad normal. Las puntuaciones individuales se suman para producir un puntaje, en donde 0= peor y 48= mejor (Beeldman *et al.*, 2015). Con base a El Escorial, la ALSFRS-R y a las manifestaciones clínicas, además de los estudios de gabinete como electromiografías, encefalogramas y estudios de neuroimagen, es que se puede realizar el diagnóstico clínico de la enfermedad. Los pacientes con cuadro sugestivo de ELA deben ser evaluados por un neurólogo experto en patologías de neurona motora y en nervio-músculo (Andersen *et al.*, 2012).

1.3 Epidemiología de la ELA

La ELA tiene una incidencia mundial de 2 afectados por cada 100,000 individuos y una prevalencia mundial de 4-7 afectados por cada 100,000 individuos, con un estimado de 1.2-4.0 afectados por cada 100,000 en población caucásica y una tasa menor en otras poblaciones étnicas. La frecuencia de esta enfermedad varía considerablemente en diferentes regiones de Europa y Norte América, y hay una incidencia particularmente alta en poblaciones del pacífico occidental como Japón y Corea del Sur. En Estados Unidos alrededor de 20,000-30,000 personas tienen ELA, y cerca de 5000 casos nuevos son diagnosticados anualmente (Kaur *et al.*, 2016). La ELA afecta personas de todas las razas y grupos étnicos, y usualmente se presenta a finales de la mediana edad o más tarde, aunque también puede presentarse en jóvenes y niños. Se ha observado que la frecuencia de casos de ELA es mayor en hombres que en mujeres (1.5-3 vs 1-2.4, respectivamente). La media de supervivencia es de 2 a 4 años desde de la edad de inicio y solo 5-10% de los pacientes sobrevive más de 10 años (Chiò *et al.*, 2013).

En cuanto a la etiología de la enfermedad, esta no se ha dilucidado por completo. Aproximadamente del 5-10 % de los casos de ELA son formas familiares (ELA-F) con patrones de herencia mendelianos, mientras que el otro 90-95% se trata de casos esporádicos (ELA-E). La importancia epidemiológica en la ELA radica en que actualmente se ha posicionado como la enfermedad de neurona motora más frecuente y como la tercer EN más común a nivel mundial, solo después de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Li & Wu, 2016).

Con respecto a México, no existen estudios epidemiológicos de la enfermedad, sin embargo, se cree que tiene una prevalencia similar a la reportada para Norte América (1.5-3 afectados por cada 10,000 individuos), aunado a esto, al igual que en otros países, es más prevalente en hombres que en mujeres. El promedio de la edad de presentación es de 47.5 años, siendo menor que en poblaciones europeas o norteamericanas. La ELA de inicio espinal es la más frecuente en pacientes mexicanos (66%) y el fenotipo de NMS es el predominante (53%). La sobrevida de los pacientes mexicanos es similar a lo descrito para otras poblaciones. Solamente 3.3% de los casos de ELA son formas familiares por lo que el 96.7% restante corresponde a formas esporádicas (Martínez *et al.*, 2014).

1.4 Genética de la ELA

La ELA puede presentarse con diferentes formas de herencia, entre ellas, autosómico dominante, autosómico recesivo, o ligado al cromosoma X. El 90% de los casos son esporádicos y no presentan una herencia genética clara. Sin embargo, el 10% restante de los casos muestran herencia familiar (Chen *et al.*, 2013). En los últimos años se han identificado diversos genes relacionados etiología de la ELA, tanto en formas familiares como esporádicas. El uso de tecnologías como los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) en pacientes con ELA han permitido la identificación de variantes génicas asociadas principalmente a los casos esporádicos (Renton *et al.*, 2014).

La mayoría de los genes asociados al desarrollo de ELA presentan una penetrancia variable y dependiente de la edad, se han identificado más de 25 genes implicados con ELA-F y ELA-E. Los genes que pueden causar una enfermedad recesiva incluye a *OPTN*, *SPG11*, *FUS*, *ALS2*, entre otros; el gen *UBQLN2* es

dominante ligado al cromosoma X. El gen *C9orf72* que presenta un hexanucleótido repetido (G₄C₂) puede provocar degeneración frontotemporal, e implica una herencia autosómico dominante, al igual que *SOD1*, *TARDBP*, *VCP*, *MATR3* y *CHCHD10*. En la Figura 4 se muestra la proporción en que los genes están implicados en los casos de ELA-F y en ELA-E, así como la proporción de casos en los que no se ha descrito un gen como agente causal de la enfermedad (Roggenbuck *et al.*, 2016).

Con la diversidad de *loci* identificados se han relacionado a fenotipos clínicos y patológicos a través de diversas causas. Por lo que se demuestra la presencia de heterogeneidad de *locus*, la cual se ha asociado también a trastornos de (NM), incluyendo los casos de ELA con DFT. Por ello, es esencial que, además de identificar los genes relacionados a la ELA, se determinen las múltiples vías involucradas en la patogénesis de la enfermedad (Siddique *et al.*, 2008).

Las mutaciones en los genes asociados al desarrollo de ELA solo explican una minoría de los casos de ELA-E. Aunado a esto, la ELA-F y la ELA-E son indistinguibles en la práctica clínica, mostrando rangos similares en la edad de inicio, la supervivencia, el fenotipo y en sus características neuropatológicas. Por ello, a medida que la secuenciación de genomas y el análisis de paneles para genes relacionados a ELA han aumentado, están siendo reportados pacientes con mutaciones en más de un gen. Dentro de estos, la expansión en *C9orf72* y las mutaciones en *SOD1* encabezan las listas como las más frecuentes. También se ha asociado una co-ocurrencia en combinaciones de genes, incluyendo a *FUS* con *ANG*, *UBQLN2* con *TARDBP* u *OPTN*. Estos casos son ejemplos posibles de herencia oligogénica, en donde las manifestaciones clínicas de la enfermedad están influenciadas por la presencia de ambas mutaciones. Sin embargo, el número de casos con 2 mutaciones es raro y aun no está claro si las segundas mutaciones influyen en la penetrancia, el fenotipo de la enfermedad o su progresión (Harms & Baloh, 2013). Un meta-análisis del traslapamiento de mutaciones entre diferentes formas de ELA y las enfermedades relacionadas ha provisto un claro entendimiento de la enfermedad sobre todo entre casos familiares y esporádicos, como también entre ELA y otras EN. De este modo, se pudo establecer un criterio de discriminación para excluir otros trastornos neurodegenerativos, obtener diagnósticos más rápidos y proveer un panorama más amplio de la enfermedad (Caballero-Hernández *et al.*, 2016).

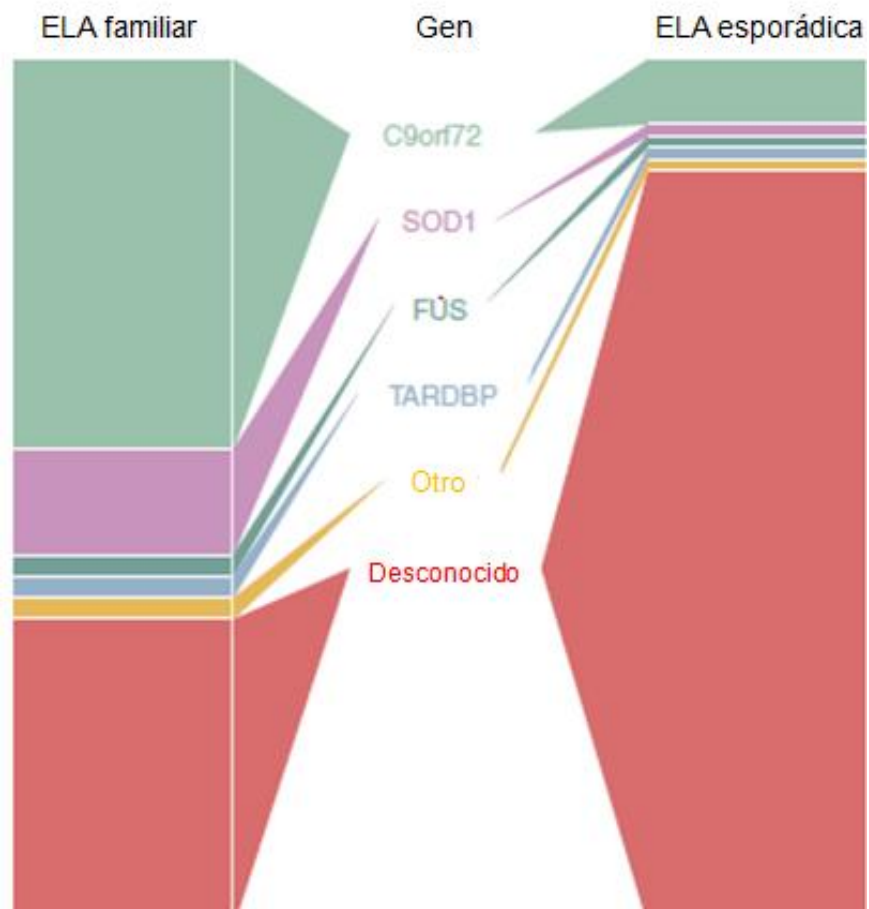


Figura 4. Proporción de casos de ELA atribuidos a cada gen. Tomado y modificado de Roggenbuck *et al.*, 2016.

Aunque se sabe que diversas mutaciones en una variedad de genes están asociados al desarrollo de ELA, hasta el momento ésta enfermedad sigue siendo poco entendida, especialmente el cómo se afecta selectivamente la biología de la NM y si los mecanismos implicados convergen en vías comunes para causar la degeneración neuronal, por eso, el abordaje a partir de otras moléculas como lo son las proteínas, podrían permitir un mayor entendimiento de la patología (Kiskinis *et al.*, 2014).

1.5 Neuroproteómica

Desde la publicación de los resultados del proyecto de secuenciación del genoma humano se sabe que el genoma se conforma por alrededor de 23,000 genes, sin embargo, se anticipa que el número de proteínas expresadas en el humano puede variar de 50,000 a 500,000. La diferencia entre el número de genes y el número de proteínas se debe al procesamiento de los transcritos de RNA (*splicing* alternativo) y modificaciones postraduccionales, entre otros. Por ello, el estudio de las proteínas permite un mejor entendimiento de la fisiología humana, donde la proteómica juega un papel esencial en el estudio de los proteomas (Pando-Robles & Lanz-Mendoza, 2009). El término proteómica fue acuñado por primera vez en 1995 y se define como el total de proteínas expresadas por el genoma de una célula, tejido u organismo, el cual implica un estudio a gran escala para caracterizar su composición, estructuras, funciones e interacciones bajo condiciones específicas (Kellner, 2000; Chandrasekhar *et al.*, 2014).

La proteómica juega un papel importante en la investigación biomédica, como por ejemplo en el descubrimiento de blancos terapéuticos de fármacos y métodos diagnósticos, debido a la relación entre proteínas, genes y enfermedades. El entendimiento de las funciones de las proteínas ayuda a una mejor comprensión de las enfermedades, la mayoría de los medicamentos actuales son proteínas o son blancos específicos de proteínas en el cuerpo. La neuroproteómica es una reciente rama/aplicación de la proteómica que se fundamenta en el estudio y abordaje de trastornos cerebrales, de modo en el que el análisis proteómico es una parte esencial de la investigación en neurociencias (Simonian, 2016).

1.5.1 El sistema glinfático y su efecto en el neuroproteoma

El sistema glinfático es un sistema de limpieza de desechos que utiliza una red de túneles perivasculares formados por células astrocíticas que promueve la eliminación eficiente de proteínas solubles y metabolitos del SNC. Este proceso biológico sucede en todos los vertebrados durante el sueño y establece la eliminación de desechos neurotóxicos (por ejemplo el β -amiloide) (Aalling *et al.*, 2015; Louveau *et al.*, 2015).

Estudios recientes han demostrado que el LCR y el fluido intersticial son intercambiados continuamente. El transporte del LCR a través del parénquima cerebral es facilitado por los canales de agua acuaporina-4 (AQP4), encontrados abundantemente en los extremos astrocíticos de la vasculatura cerebral. El movimiento del LCR periarterial a través del parénquima cerebral facilita el transporte de solutos intersticiales hacia vías de drenaje perivenoso, permitiendo así, el paso de proteínas y moléculas pequeñas directamente del SNC al torrente sanguíneo, siendo de gran relevancia para estudios moleculares de enfermedades neurodegenerativas como la ELA (Aalling *et al.*, 2015).

Los biofluidos como la sangre y el LCR representan una ventaja en términos de confiabilidad y disponibilidad, además de que pueden ser obtenidas bajo condiciones más controladas. Las proteínas encontradas en este tipo de muestras se han empleado y aplicado a la clínica para el diagnóstico, como biomarcadores y como blancos terapéuticos. En contraste al LCR, la sangre está separada físicamente del SNC por la barrera hematoencefálica (BHE), sin embargo, desde que el LCR alcanza el seno venoso dural, las proteínas contenidas en este pasan al torrente sanguíneo, encontrándose moléculas del SNC en la sangre (Ryberg & Bowser, 2008).

1.5.2 Proteómica de la ELA

Recientemente, la evidencia de estudios multicéntricos arroja la presencia de marcadores proteómicos para la ELA en diversos tejidos y líneas celulares. Diversos estudios proteómicos han mostrado que las principales proteínas implicadas en la enfermedad se relacionan con respuesta inflamatoria aguda, factores neurotróficos, proteínas transductoras de señales, mantenimiento de matriz extracelular (MEC), respuesta inmune y control de actividad proteolítica (Chen *et al.*, 2016).

La gama de biofluidos humanos útiles para estudios proteómicos incluye al LCR, sangre, orina y saliva. Estas muestras permiten el descubrimiento de proteínas relacionadas con la función neuronal debido a su aproximación con diversas regiones del cerebro o a su relación con el transporte de moléculas de desecho de diversas regiones cerebrales o de la médula ósea. El análisis de los diferentes biofluidos ha permitido determinar los cambios en la abundancia y/o presencia de proteínas individuales en pacientes con ELA con respecto a individuos control o individuos con otras enfermedades neurológicas, generalmente empleando métodos basados en geles de poliacrilamida o por ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Estudios más complejos emplean espectrometría de masas o análisis proteómicos para generar perfiles e identificar proteínas diferencialmente expresadas (Turner *et al.*, 2013). Cabe destacar que los mecanismos moleculares que regulan el inicio, la progresión y los procesos patogénicos de la enfermedad aún son desconocidos, por ello, el conocimiento de las proteínas que participan en dichos procesos resulta esencial para la determinación asertiva de diagnóstico, pronóstico e intervenciones terapéuticas (Bowser *et al.*, 2006).

1.6 Patogénesis de la ELA

El entendimiento de los procesos fisiopatogénicos celular que recaen en la disfunción de las neuronas motoras en la ELA es un prerequisite esencial para el abordaje terapéutico de la enfermedad. Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado cambios patológicos en neuronas motoras, estos cambios incluyen disfunción mitocondrial, agregación de SOD1 (superóxido dismutasa 1), disrupción del citoesqueleto, déficits en el transporte axonal, activación de señales de muerte celular y estrés oxidativo (Gordon, 2013). Estos eventos patológicos reflejan la participación de una única vía de señalización, o incluso múltiples vías que actúan en paralelo comprometiendo a las neuronas motoras. Basado en esto, la excitotoxicidad inducida por glutamato es probablemente el nodo de convergencia para múltiples cascadas de señalización. El incremento de la excitotoxicidad inducida por glutamato se ha observado en pacientes con ELA y es causada por un aumento en la liberación de glutamato, potenciado por la actividad de canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v). La excitotoxicidad por glutamato incrementa el influjo de Ca^{2+} en las

NM y las interneuronas; este exceso de Ca^{2+} puede alterar la función de la mitocondria en NM, por lo que la disfunción mitocondrial es, probablemente, un evento central que conlleva a fallas energéticas y metabólicas que desencadenan respuestas de estrés celular, afectación en la función del axón de la NM (incluyendo la transmisión en la unión neuromuscular) y, por consiguiente, conduciendo a señalización de muerte celular (Zundert *et al.*, 2012). Hasta el momento el Riluzole es uno de los fármacos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la ELA, el Riluzole puede prolongar la sobrevivencia de los pacientes de 3-5 meses, su mecanismo de acción es mediante el bloqueo de los canales Na_v , lo que reduce el influjo de iones de calcio e indirectamente previene la estimulación de receptores de glutamato (Miller *et al.*, 2012).

Los mecanismos que conllevan a la neurodegeneración en ELA son multifactoriales (Figura 5) y operan a través de rutas moleculares y genéticas. La neurodegeneración en la ELA puede resultar de una compleja interacción de excitotoxicidad por glutamato, generación de radicales libres; agregados citoplasmáticos de proteínas como SOD1, TARDBP (proteína TAR de unión a DNA), FUS (*Fused in Sarcoma*), entre otras; disfunción mitocondrial y de bombas iónicas e interrupción de procesos de transporte axonal (por acumulación de agregados intracelulares de neurofilamentos). La activación de la microglía resulta en la secreción de citocinas proinflamatorias, conllevando a la neurotoxicidad. La neurodegeneración puede ocurrir también a través de la activación de procesos enzimáticos dependientes de calcio (Kiernan *et al.*, 2011).

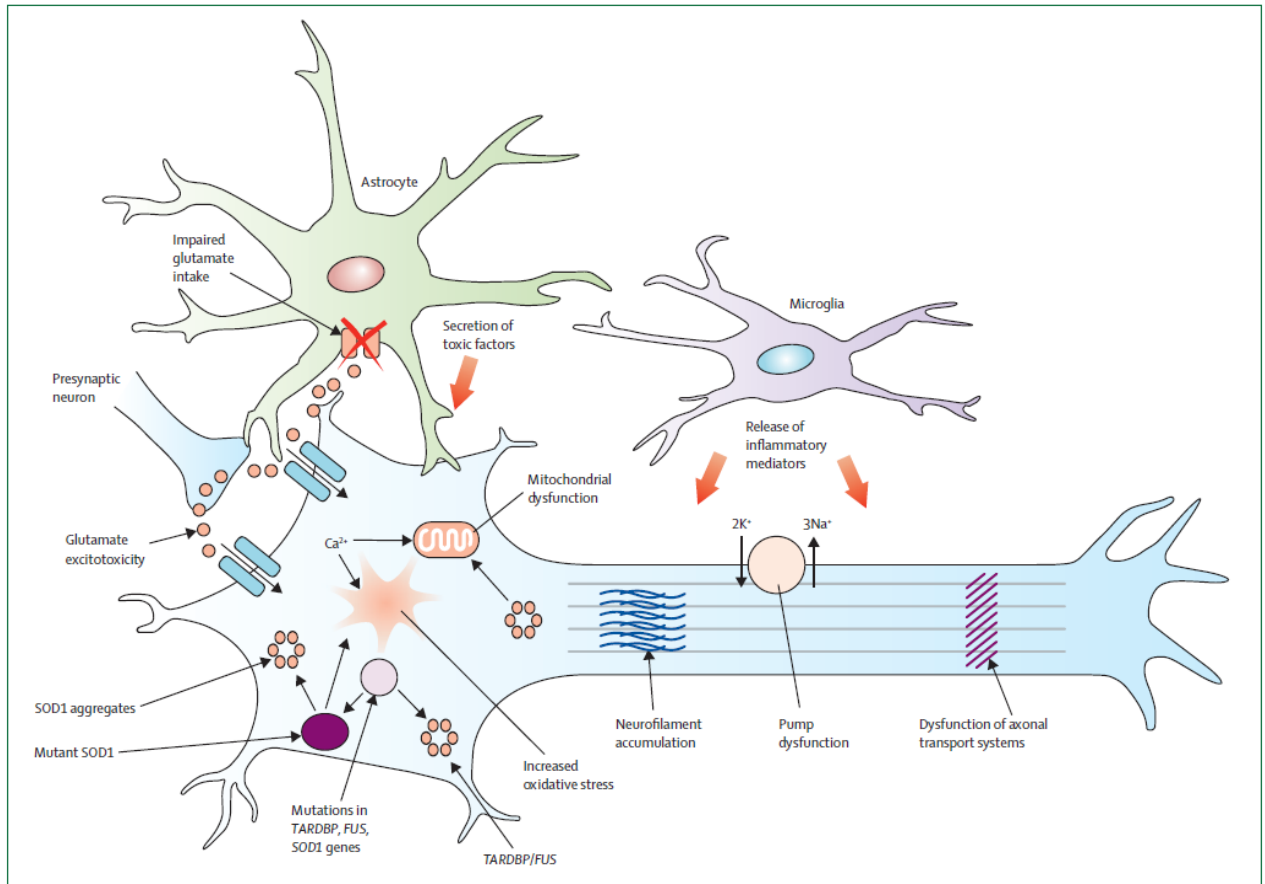


Figura 5. Procesos celulares y moleculares que participan en la neurodegeneración de la ELA. Tomado de Kiernan *et al.*, 2011.). Los mecanismos que conllevan a la neurodegeneración en ELA son multifactoriales y operan a través de rutas moleculares y genéticas. La neurodegeneración en la ELA puede resultar de una compleja interacción de excitotoxicidad por glutamato, generación de radicales libres, agregados citoplasmáticos de proteínas, disfunción mitocondrial, e interrupción de procesos de transporte axonal (por acumulación de agregados intracelulares de neurofilamentos). La activación de la microglía resulta en la secreción de citocinas proinflamatorias, conllevando a la neurotoxicidad.

Otra evidencia relevante en la patogénesis de la ELA es la participación de la proteína TARDBP, reconocida como el mayor componente de los agregados proteicos ubiquitinados en la mayoría de los pacientes con ELA esporádica. Actualmente se sabe que los agregados proteicos patológicos en el cerebro son diseminados. Estudios de imagen por resonancia magnética sugieren que la ELA se puede dispersar a través de canales de neuronas vulnerables y que las proteínas SOD1 y TARDBP poseen dominios tipo prion, por lo que pueden inducir un cambio conformacional en proteínas normales, conllevando a la transmisión célula-célula (Gordon, 2013).

Otro posible mecanismo patogénico es la afectación a la BHE, la barrera hematoespinal (BHS), o la barrera hemato-LCR, agravando el daño neuromotor. Dentro de los factores que afectan la vasculatura neuronal destaca la influencia del sistema inmune, debido a su relación con procesos de inflamación que conllevan a la muerte neuronal. En este proceso un incremento en la participación de la microglía, astrocitos, IgG y linfocitos T, los cuales juegan un papel clave en la neuroinflamación mediante la secreción de numerosas citocinas en el tallo cerebral y médula espinal de pacientes con ELA. La presencia de citocinas como la interleucina (IL) 1 α , IL-1 β , e IL-1RA; la enzima proinflamatoria ciclooxigenasa tipo 2 y la desregulación del gen TNF- α han sido identificados como efectores del daño a neuronas motoras. Otro factor que participa en la afectación de la neurovasculatura es el estrés oxidativo, el cual es resultado de procesos como la excitotoxicidad, la activación de vías inflamatorias (cinina, ácido araquidónico y modulados por calcio), la disfunción mitocondrial, el reclutamiento de leucocitos y la activación de microglía. En particular, las especies reactivas de nitrógeno (NOS) y de oxígeno (ROS) juegan un papel importante en el daño de tejido durante la inflamación, afectando la permeabilidad de la BHE/BHS en múltiples formas. Por último, otro factor a considerar en la patogénesis neurovascular en la ELA es la activación desregulada de las metaloproteasas de matriz (MMP) en donde ciertos tipos específicos participan en la degradación de la membrana basal endotelial y de las uniones estrechas (Garbuzova-Davis *et al.*, 2011).

1.7 Desregulación proteolítica en la ELA

En condiciones fisiológicas la MEC es constantemente mantenida por las MMP, las cuales se encargan del procesamiento de elementos estructurales y son responsables del remodelado de tejido en condiciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas (Yabluchanskiy *et al.*, 2013). Las MMP son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc con capacidad de catalizar un amplio rango de sustratos, incluyendo componentes de la membrana basal y de la MEC (Nagase *et al.*, 2006). Son importantes reguladores de diversas funciones biológicas como mantenimiento de la MEC, crecimiento, reorganización de tejidos, elongación axonal, diferenciación neuronal y angiogenesis; sin embargo, también están involucradas en varios procesos patológicos (Swarnakar *et al.*, 2011). La familia de las MMP se subdivide en cinco grupos. Conforme a su estructura y función en: colagenasas (MMP-1, -8, -13), gelatinasas (MMP-2, -9), matrilisinas (MMP-7), estromelisin (MMP-3, -10) y MMP de membrana (MT.MMP-1). Las MMP son producidas por leucocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, algunos tipos de neuronas, células microgliales y astrogiales (Nagase *et al.* 2006; Asahina *et al.* 2001; Forsyth *et al.* 1999).

Estructuralmente, las MMP son divididas en tres dominios: una región propéptido amino terminal, un dominio catalítico amino terminal (que contiene un motivo de dedos de zinc) y un dominio carboxilo terminal que involucra la unión a sustrato en MEC (Yong *et al.*, 2001).

Una MMP es producida en primera instancia en su proforma y se requiere una conversión subsecuente a su forma activa. Los radicales libres, las serín proteasas y otras MMP activadoras están entre los factores que convierten una pro-MMP a una enzima activa (Yong *et al.*, 2007). La actividad de las MMP está altamente regulada debido a que su estado activo puede ser perjudicial, por ello son moduladas en varios niveles: activación transcripcional, remoción de predominio, interacción con componentes de la MEC e inhibición por inhibidores endógenos como los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) (Lukaszewics *et al.*, 2014; Brkic *et al.*, 2015).

Las MMP están involucradas en la patogénesis de diversas EN como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson,

traumatismos, daño en médula ósea y ELA. En la ELA, las MMP tienen la capacidad de matar neuronas, por lo que juegan un papel importante en el proceso de degeneración neuromuscular y en la pérdida de la función motora. Estas MMP participan en la degradación de la BHE, músculo y BHS; facilitando la invasión neural de leucocitos en presencia de neuroinflamación (Niebroj-Dobosz *et al.*, 2010), también, las MMP pueden entrar al SNC mediante la disrupción de la vasculatura y conllevando al deterioro de la BHE. En pacientes con ELA, la alta concentración de MMP y su indiscriminada localización en SNC contribuye a la desmielinización, muerte neuronal y oligodendrocítica, axotomía de nervios periféricos, destrucción y denervación de tejidos (Yong *et al.*, 2001).

2. Antecedentes

La implementación en la identificación de moléculas que apoyen las observaciones clínicas en la ELA ha sido un campo que permite establecer un diagnóstico temprano, información sobre el pronóstico, monitoreo de la progresión en triadas clínicas y proveer un mejor entendimiento de la patogénesis de la enfermedad (Costa & Carvalho, 2016).

Los análisis proteómicos de ELA en humanos se encuentran actualmente muy limitados por diversas cuestiones como, por ejemplo, las técnicas invasivas de muestreo, por lo que su aplicación es limitada. La proteómica basada en espectrometría de masas (MS) se ha convertido en una herramienta indispensable para la cuantificación e identificación de alteraciones en la presencia y abundancia de proteínas específicas del proceso patológico de la enfermedad. Para el análisis de muestras del SNC, la electroforesis bidimensional (2-DE) en combinación con MS o MS en tándem han demostrado ser muy efectivas. Aunque la 2-DE provee una excelente resolución se han desarrollado alternativas proteómicas que pueden ser usadas en experimentos proteómicos a gran escala (Elf *et al.*, 2014).

Hasta el momento no existe un modelo coherente de la patogénesis de la enfermedad, sin embargo, diversos enfoques han identificado alteraciones genéticas asociadas con ELA, sin embargo, el estudio de las alteraciones proteómicas han sido poco exploradas (Engelen-Lee, 2016).

La perspectiva proteómica puede ampliar el entendimiento de la ELA en términos de fisiopatología. Bajo este contexto, los estudios proteómicos en ELA deben ser acompañados de una verificación y validación, para su posterior aplicación en la clínica. Hasta el momento, solo pocos estudios se han enfocado a la búsqueda de proteínas alteradas en ELA. Cabe destacar que las proteínas sub o sobre-reguladas hasta ahora descritos en pacientes con ELA no son del todo específicas en términos de diagnóstico (Krüger *et al.*, 2013).

El análisis proteómico de muestras biológicas de pacientes con ELA es una alternativa emergente para el descubrimiento de biomarcadores. A la fecha la mayoría de estos estudios proteómicos se han realizado en LCR. Si bien, el LCR puede ser considerado tejido específico, el muestreo requiere de una punción lumbar

que resulta incomoda y dolorosa para el paciente; con riesgos que van desde un dolor de cabeza hasta un daño a nervios y paraplejia. El plasma y el suero representan una alternativa al LCR, aunque refleja una compleja colección de diversos tejidos y tipos celulares, careciendo de especificidad tisular; sin embargo, es factible su estudio en grupos de pacientes fenotípicamente bien caracterizados (Tremlett *et al.*, 2014).

Los análisis proteómicos no se limitan solamente al uso de plasma o LCR, las biopsias de músculo; muestras de medula espinal o cerebro (postmortem); la saliva e incluso la orina pueden arrojar datos relevantes para la clínica, mediante la identificación de las proteínas contenidas en ellas. El conocimiento de estas moléculas y su implicación en la ELA permitirá proveer información para el pronóstico, como la tasa de progresión; la predicción de su participación en la enfermedad (por ejemplo, la disfunción de NMS ó NMI, presencia de demencia, disfunción respiratoria, etc.); el predecir el éxito o fracaso terapéutico; correlacionar la respuesta terapéutica en análisis seriales; proveer información adicional sobre a patogénesis de la enfermedad; y emplearlas como biomarcadores en ensayos clínicos (Bowser & Lacomis, 2009).

Collins *et al.* (2015), con el objetivo de identificar nuevas proteínas, vías alteradas y posibles biomarcadores en ELA analizaron perfiles de proteómica comparativa a partir de LCR de pacientes estadounidenses con ELA esporádica, controles sanos, y otras EN (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple). Se detectaron un total de 1712 proteínas en LCR. La abundancia de diversas proteínas así como sus funciones biológicas fueron significativamente alterados en las muestras de ELA, predominantemente relacionada a inflamación, actividad neuronal y regulación de MEC. Las proteínas WDR63, APLP1, SPARCL1 y CADM3 mostraron concentraciones mayores a las observadas en los casos de ELA, con respecto a los controles y al grupo de otras EN. Su especificidad en la ELA las propone como posibles biomarcadores, sin embargo, es difícil de predecir o establecer el papel que juegan en las enfermedades de NM o en la ELA.

En pacientes europeos (alemanes, belgas, suizos, ingleses, polacos, italianos, españoles, franceses y turcos) y estadounidenses con ELA se han observado cambios en los patrones de fosforilación de neurofilamentos. La hiperfosforilación de la cadena pesada de los neurofilamentos ha sido detectada en LCR y en sangre. La

hiperfosforilación de las cadenas pesadas y ligeras de los neurofilamentos es significativamente mayor en pacientes con ELA, comparado con individuos sanos. Esto implica errores en: mecanismos de transporte axonal, metabolismo de proteínas, plegamiento erróneo y acumulo de las mismas (Oeckl *et al.*, 2016).

La caracterización proteómica de plasma/suero de pacientes con ELA ha permitido una asociación relevante de las proteínas diferencialmente encontradas en los pacientes con la clínica, proponiéndose a diversas moléculas como posibles biomarcadores de la enfermedad. Dentro de estas moléculas se ha identificado hormonas y factores de crecimiento (insulina, EPO, FGF-2, PEDF, etc.); proteínas relacionadas a inflamación (caspasa-1, TNF- α , quimiocinas, entre otras); proteínas específicas de neuronas (factores neurotróficos); enzimas e inhibidores enzimáticos (CysC, angiogenina, MMP, TIMP), así como otras proteínas (VGF, TTR, A β 42) (Conraux *et al.*, 2013).

Las MMP también han sido descritas como agente causal de la degeneración neuromuscular en la ELA, dentro de estas se encuentran la MMP-1, la MMP-2 y la MMP-9. La MMP-9 ha sido caracterizada como la principal proteasa que participa en el desarrollo y progresión de la ELA, incluso, se ha comparado su expresión y actividad en LCR con suero sanguíneo (Figura 6), presentando un incremento en la actividad proteolítica a nivel de suero. En LCR la actividad proteolítica se encuentra a nivel basal (casi imperceptible). Los niveles elevados de la actividad proteolítica de la MMP-9 se relaciona directamente con la denervación de los músculos, en la degeneración de músculos periféricos y la pérdida de neuronas motoras, conllevando a la pérdida del tono muscular, debilidad, calambres y fasciculaciones (amiotrofia, característica de la ELA) (Beuche *et al.*, 2000).

Las MMP han sido relacionadas también con el daño en la piel en pacientes con ELA, particularmente la MMP-9, lo que representa un factor en común entre neurodegeneración y cambios cutáneos en individuos con esta enfermedad. Esto sugiere que el estrés oxidativo y las citocinas microgliales contribuyen al incremento de la actividad de la MMP-9 en diversos estadios de la enfermedad (Fang *et al.*, 2010).

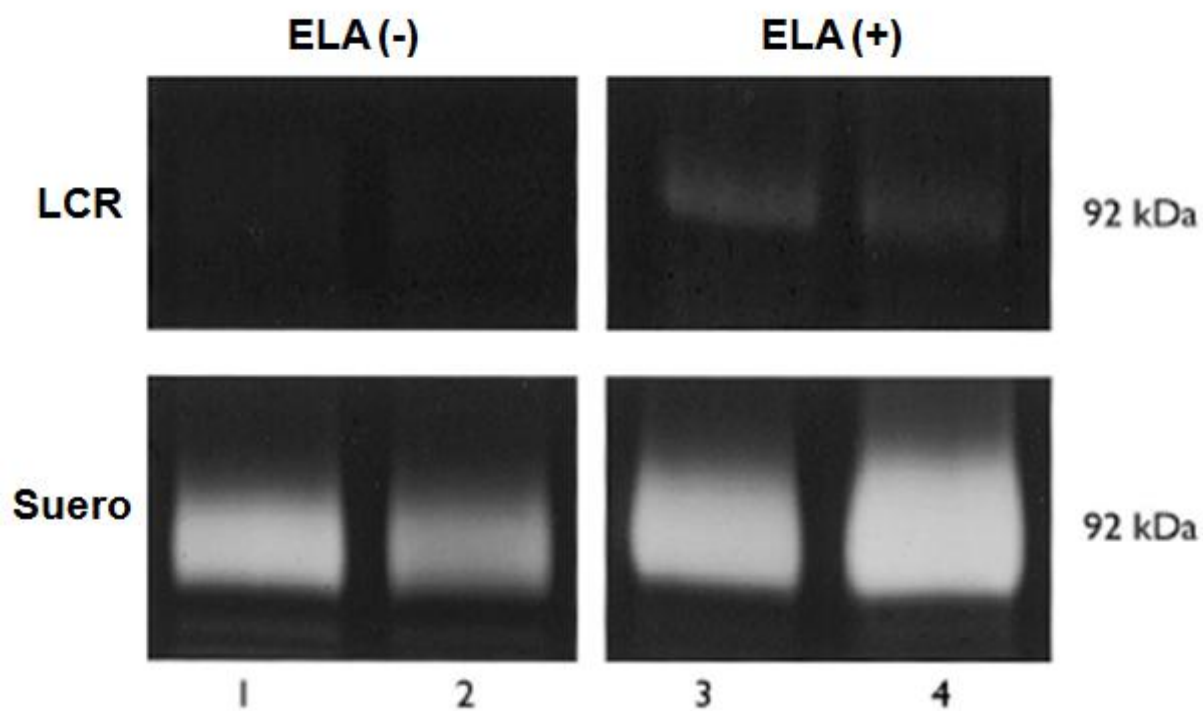


Figura 6. Actividad proteolítica de la MMP-9 en pacientes con ELA. En la figura se ilustra un zimograma de muestras de LCR y suero de sujetos sanos (ELA -) y pacientes con ELA (ELA +). La banda de 92 kDa corresponde al peso molecular de la MMP-9, en el caso de la actividad en suero se aprecia una mayor actividad proteolítica en pacientes con ELA.

3. Justificación

En México actualmente no se han realizado estudios proteómicos de la ELA, lo cual es esencial debido al número de casos en el país. Este trabajo propone analizar mediante proteómica comparativa las alteraciones presentes en el perfil proteómico de los pacientes con ELA.

Las aproximaciones proteómicas han sido empleadas para estudiar cambios en la expresión de proteínas en muestras de pacientes diagnosticados con ELA., sin embargo, las muestras (generalmente LCR) se obtienen por métodos extremadamente invasivos para el paciente; por lo que el estudio de muestras obtenidas con un menor grado de invasión para el abordaje molecular de la enfermedad es necesaria.

El conocimiento de las proteínas implicadas en la ELA permitirá proveer información para determinar un pronóstico así como la tasa de progresión de la misma; predecir su participación en la enfermedad; establecer una respuesta terapéutica mediante la identificación de una vía desregulada en la enfermedad; correlacionar la respuesta terapéutica con aspectos moleculares; proveer información sobre la patogénesis de la enfermedad; establecer una correlación molecular con las características clínicas y posteriormente validarlas como biomarcadores moleculares de la enfermedad cuya funcionalidad apoye ensayos clínicos.

Este trabajo propone el abordaje proteómico de pacientes con ELA mediante un muestreo con menor grado de invasión a partir de plasmas sanguíneos. De este modo dichas proteínas podrían ayudar en el establecimiento de un diagnóstico, conocimiento, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

4. Hipótesis

El plasma de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica presenta una expresión diferencial de proteínas, con respecto a individuos sanos. Algunas de estas proteínas estarán involucradas en procesos asociados directamente al desarrollo de la enfermedad.

5. Objetivos

Objetivo general

Determinar a través de un análisis proteómico la expresión diferencial de proteínas en los plasmas de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Objetivos particulares

- 1) Obtener el perfil proteómico de los plasmas de pacientes con ELA y compararlos con los de individuos clínicamente sanos.
- 2) Identificar las proteínas diferencialmente expresadas en el plasma de los pacientes con ELA.
- 3) Analizar las vías y procesos celulares en los que participan las proteínas identificadas y su posible participación en el proceso patológico de la ELA.
- 4) Evaluar si se correlaciona la abundancia de las proteínas desreguladas y las manifestaciones clínicas de los pacientes.

6. Estrategia experimental

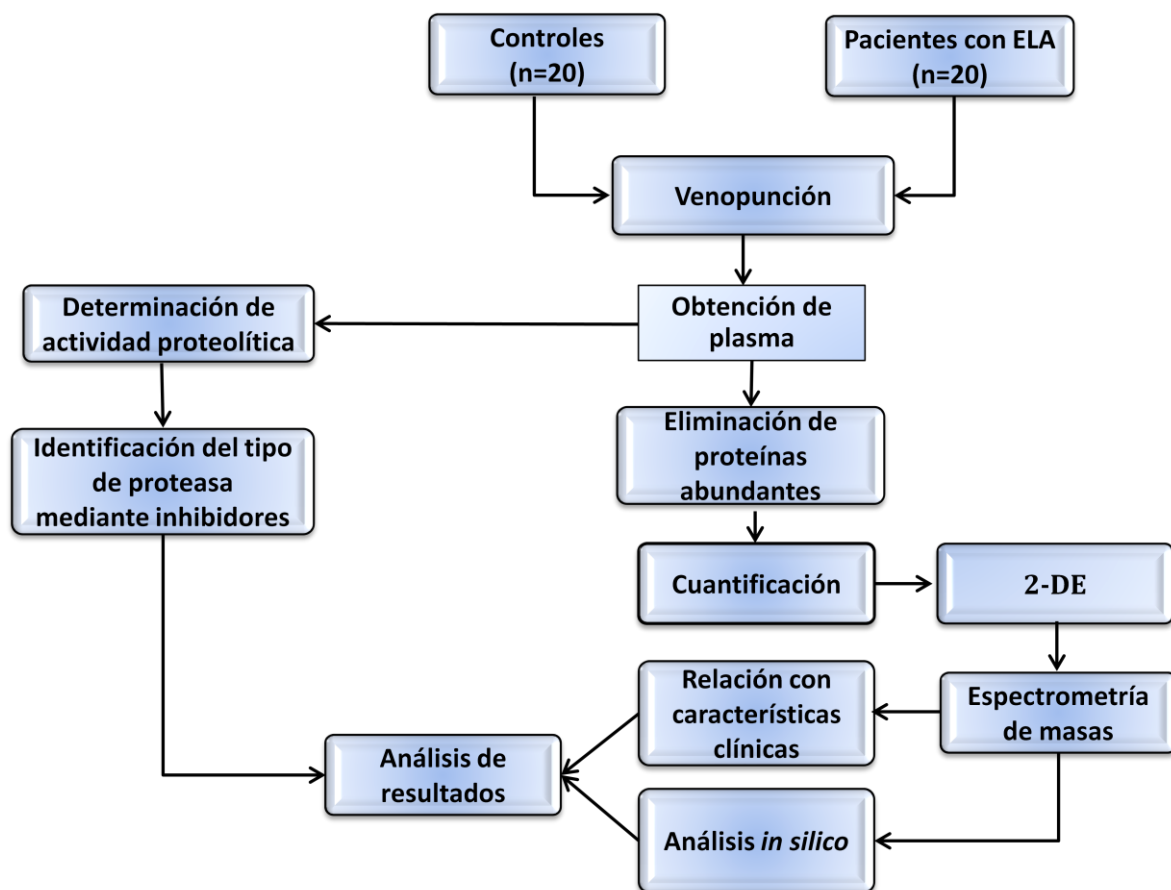


Figura 7. Diagrama de flujo general de la estrategia experimental realizada.

7. Materiales y métodos

7.1 Población de estudio

Se estudió una cohorte de 20 pacientes con diagnóstico de ELA esporádica, el número de muestras fue determinado mediante una prueba de n muestral, en donde se obtuvo una $n=10$ (95% confianza) para que los resultados arrojen significancia estadística. Como controles se utilizaron muestras de plasma obtenidas de 20 individuos clínicamente sanos sin antecedentes familiares de enfermedades neurodegenerativas, los cuales se parearon por edad y género con los 20 pacientes con diagnóstico de ELA, atendidos en el departamento de Neurogenética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN). Las muestras se tomaron previo consentimiento informado, aprobado por el comité de bioética del INNN (Apéndice 1).

7.2 Diseño del estudio

Tipo de estudio: Transversal, descriptivo de casos y controles

7.2.1 Criterios de inclusión de pacientes.

- A) Pacientes que presenten características clínicas de ELA esporádica posible, probable y definida, según El Escorial.
- B) Individuos que presenten un puntaje ≤ 35 en el ALSFRS
- C) Individuos que presenten manifestaciones clínicas de ELA clásica en cualquier rango de edades.
- D) Que el paciente sea mexicano.
- E) Que el paciente acepte participar en el estudio y firme la carta de consentimiento informado.

7.2.2 Criterios de exclusión de pacientes

- A) Que el individuo presente un diagnóstico de ELA familiar.
- B) Individuos con un puntaje ≥ 36 en el ALSFRS
- C) Que reciba algún tratamiento farmacológico o alternativo.

- D) Que el paciente tenga antecedentes de alguna enfermedad neurológica o neurodegenerativa.
- E) Que el paciente no sea mexicano.
- F) Que el paciente no acepte participar en el estudio.

7.2.3 Criterios de inclusión de controles

- A) Individuos clínicamente sanos sin antecedentes de enfermedades neurológicas o neurodegenerativas.
- B) Puntaje ≥ 36 en el ALSFRS.
- C) Que no hayan recibido tratamientos farmacológicos o alternativos en el último mes.
- D) Que sea mexicano.
- E) Que acepte participar en este estudio y firme carta de consentimiento informado.

7.2.4 Criterios de exclusión de controles

- A) Individuos con antecedentes de enfermedades neurológicas o neurodegenerativas.
- B) Puntaje ≤ 35 en el ALSFRS.
- C) Que hayan recibido tratamientos farmacológicos o alternativos en el último mes.
- D) Que no sea mexicano.
- E) Que no firme la carta de consentimiento informado.

7.3 Obtención muestras

De cada paciente se obtuvieron 6 mL de sangre periférica mediante venopunción en tubos *Vacutainer* con citrato de sodio como aditivo anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas a 3,000 rpm por 5 min para separar el plasma del componente celular, el plasma fue colocado en tubos de 1.5 mL y preservado a -80°C en el banco de plasmas del INNN hasta el momento de su uso.

7.4 Determinación de actividad proteolítica

La actividad de proteasas se evaluó utilizando el método reportado por Frankowski *et al.* 2012; el cual consiste en la realización de diluciones (1:100) del plasma con PBS

(1X, pH 7), posteriormente a la muestra diluída se le añadieron 10 μ L de amortiguador de muestra nativo (Apéndice 2). Las muestras se incubaron 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se resolvieron en geles de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato de sodio (SDS) y gelatina al 1%. La corrida electroforética se realizó con amortiguador de corrida (Apéndice 2) 1X a 100 V por 2 h.

Una vez terminada la electroforesis los geles fueron lavados tres veces por 20 min con una solución de Triton X100 al 2.5%. Posteriormente se incubaron durante 48 h a 37°C con el amortiguador de activación. Finalmente se tiñeron con azul de Coomassie R-250 con agitación constante durante 8 horas y posterior a eso se destiñeron con la solución desteñidora (Apéndice 2). La actividad de las proteasas se midió con base a la degradación de gelatina, observándose como bandas claras sobre un fondo oscuro. La actividad se midió por densitometría mediante el uso del software Image LabTM (Bio-Rad).

7.5 Identificación de proteasas

Para determinar la presencia de metaloproteasas de matriz se usaron inhibidores específicos. Para esto, se prepararon las muestras (similar a lo descrito en el punto 7.4) y se les añadieron 5 μ L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [5 mM] como inhibidor. Los productos se resolvieron en geles de sustrato y la actividad se determinará de igual forma que el punto anterior.

7.6 Eliminación de proteínas abundantes

Para el análisis de las proteínas del plasma por 2-DE es necesaria la eliminación de las proteínas más abundantes (albúmina e inmunoglobulinas) que pudieran sesgar el análisis proteómico. Para esto se empleó el método de reportado por Chen *et al.*, 2005; el cual consiste en poner 250 μ L de plasma en un tubo de 1.5 mL, a este se le adicionaran 3 volúmenes (750 μ L) de una solución de acetona fría y ácido tricloroacético (TCA) [10%]. Posteriormente se incubó durante 90 min a -20°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla fue centrifugada a 15,000 X g por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y la pastilla fue lavada con 1 mL de acetona fría, la muestra se homogeneizó en vórtex y se centrifugó a 13,000 x g por 5 min a 4°C, el proceso de lavado se repitió cinco veces.

La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min. Para eliminar sales, lípidos y agentes que interfirieran con el isoelectroenfoque (IEF) las muestras se procesaron con el estuche comercial ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las proteínas fueron resuspendidas en 200 µL de solución TUC (Apéndice 2). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

7.7 Cuantificación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (microensayo). Este método se fundamenta en la unión del azul de Coomassie a los residuos aromáticos y básicos de las proteínas; el colorante se torna de rojizo a azul y el máximo de absorción del colorante cambia de 465 a 595 nm. El cambio en la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

Para la curva estándar se utilizó Albumina bovina (Sigma-Aldrich) a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL. Se adicionaron 10 µL de la curva estándar o de muestra problema a un pozo de una placa de 96 pozos con 250 µL de reactivo de Bradford. La placa se analizó en un lector de ELISA BIO-TEK® ELx-800 a una longitud de onda de 595 nm.

7.8 Análisis de integridad

Para determinar la integridad de las muestras previo a la 2-DE se realizó una electroforesis en una dimensión (1-DE) con el objetivo de verificar que las proteínas no se degradaron durante los procesos previos. Para esto se tomaron 100 µg de las muestras procesadas y se les añadió 10 µL de amortiguador de muestra (Apéndice 2). Las muestras se hirvieron durante 5 min y se resolvieron en geles de poliacrilamida con SDS. El análisis de integridad se realizó en una electroforesis discontinua con dos tipos de geles: un gel concentrador al 4% y un gel separador al 10% (Tabla 1). La corrida electroforética se llevo a cabo con el amortiguador de corrida y una vez concluida los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 durante 8 h, posteriormente se destiñeron con solución desteñidora y se analizaron con el software Image Lab™ (Bio-Rad).

Tabla 1. Condiciones para la elaboración del gel separador y concentrador.

Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
Agua Milli-Q	6.25 mL	3.05 mL
Tris-HCl (pH 8.8) [1.5 M]	3.75 mL	-
Tris-HCl (pH 6.8) [1.5 M]	-	1.25 mL
Acrilamida/bisacrilamida (29.2%/0.8%)	5 mL	0.650 mL
Persulfato de amonio	70 μ L	30 μ L
N, N, N, N'-tetrametilen- diamina (TEMED)	20 μ L	10 μ L

7.9 Electroforesis bidimensional

7.9.1 Separación en primera dimensión

Para el isoelectroenfoque (IEF) se emplearon tiras ReadyStrip™ IPG Strips (Bio-Rad) de 7 cm con un gradiente de pH inmovilizado de 3-10. Cada tira fue hidratada pasivamente por 18 h con 130 µg de proteína solubilizada en amortiguador de rehidratación (Tabla 2), anfolinas (100X BioLyte® 3-10, Bio-Rad) [1%], 10 µL de coctel de inhibidores de proteasas y azul de bromofenol (0.001%). Cada muestra de paciente se analizó por triplicado para asegurar la reproducibilidad.

Después de la rehidratación pasiva, la tira se colocó en una charola del sistema PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad), se colocaron *paper-bridge electrode wicks* humedecidas con 20 µL de H₂O grado proteómico en cada electrodo en los extremos de la tira. Por último la tira se cubrió con aceite mineral y se montó en el equipo para realizar una segunda rehidratación.

Las tiras se rehidrataron una segunda vez de forma activa a 50 V por 5 h a 20°C. Posterior a la rehidratación se continuó con el IEF a 20°C utilizando las siguientes condiciones: 200 V/1 h; 500 V/1 h; 1000 V/1 h y 10,000 V/9 h.

Las proteínas enfocadas en las tiras fueron equilibradas, para esto, primero fueron reducidas y posteriormente alquiladas. Cada tira se colocó en un tubo de 15 mL con 5 mL de amortiguador de equilibrio (Apéndice 2) y DTT [1%] como agente reductor por 30 min. Para la segunda fase de equilibrio se colocaron 5 mL de amortiguador de equilibrio y iodoacetamida [2.5%] como agente alquilante.

7.9.2 Separación en segunda dimensión

La segunda dimensión consistió en separar las proteínas con base a su peso molecular, para ello las tiras equilibradas se colocaron inmediatamente sobre un gel separador (SDS-PAGE) al 10% (mismas condiciones que en la Tabla 1) y se cargó un pozo con un marcador de peso molecular de 10-250 kDa (Precision Plus Protein™ Dual Color Standar, Bio-Rad). Los geles fueron sellados con agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (ReadyPrep™ Overlay Agarose, Bio-Rad). El corrimiento electroforético se llevó a cabo en un sistema vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell System (Bio-Rad). Los geles se corrieron a 70 V hasta que el frente de corrida

alcanzó el borde del gel. Una vez concluida la corrida electroforética los geles fueron incubados por 8 h con solución fijadora y finalmente teñidos con azul de Coomassie G-250 por 12 h.

Tabla 2. Componentes del amortiguador de rehidratación para IEF de las tiras.

Reactivo	Concentración
CHAPS	4%
Dithiothreitol (DTT)	160 mM
Urea	7 M
Tiourea	2 M
Glicerol	5%
Triton X100	0.05%

7.10 Análisis de los geles

Los geles fueron desteñidos con H₂O grado MS (tres lavados de 2 h cada uno), y posteriormente fueron digitalizados con un escáner PharosFXTM Plus Molecular Imager (Bio-Rad).

Una vez digitalizados, las imágenes fueron analizadas con el software PDQuest 2D Analysis (Bio-Rad). Este software detecta y cuantifica *spots* de proteínas y mediante un algoritmo estadístico determina las diferencias que se encuentran en los geles de interés. La reproducibilidad de los perfiles proteómicos fue evaluada con el software tomando en cuenta los triplicados de cada muestra.

Para los *spots* que hicieron *match*, se ajustaron los parámetros para asegurar que los *spots* encontrados correspondían a la misma coordenada en cada gel. Los *spots* que hicieron *match* fueron analizados para establecer los valores relativos de concentración de proteína.

7.11 Identificación de proteínas por MALDI-MS

Los *spots* de interés fueron cortados con una punta de micropipeta de 1 mL. Cada *spot* se colocó en un tubo de 1.5 mL con 250 µL de H₂O grado MS. Los *spots* fueron enviados a la Unidad de Proteómica Médica del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) para su análisis por MS.

Los *spots* fueron desteñidos con ACN: NH₄HCO₃ [50mM] (50:50 v/v). La digestión proteica se llevó a cabo durante 18 horas a 37°C con tripsina grado masas (Promega V528A). Los péptidos obtenidos de la digestión se extrajeron del gel con una solución de ACN:H₂O:ácido fórmico (50:45:5 v/v), el volumen de la muestra se disminuyó en un concentrador (Eppendorf 5301). Las muestras se desalaron utilizando columnas C18 (ZipTipC18).

Las muestras se analizaron por sextuplicado en un MALDI TOF/TOF 4800 utilizando como matriz α -ciano.

Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó un análisis con el algoritmo de búsqueda Paragon del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66%.

7.12 Análisis *in silico* de funciones biológicas

Las proteínas identificadas fueron analizadas *in silico* usando la base de datos DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*). Para su clasificación se empleó la función de anotación funcional de proteínas y ontología de genes. El análisis contempló la función, localización celular, actividad biológica y enfermedades relacionadas a mutaciones en el gen codificante de la proteína analizada. Dirección web: <https://david.ncifcrf.gov/>.

7.13 Análisis clínico-proteómico

Las características clínicas de cada paciente fueron obtenidas de sus expedientes clínicos, entre los criterios que se consideraron fueron la edad de inicio, evolución, forma de presentación, índice de Kimura y la ALSFRS. Para determinar si hay correlación entre las manifestaciones clínicas y la actividad proteolítica de cada paciente se realizó una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov con la finalidad de determinar la distribución de los datos y un análisis de correlación acorde a la distribución de los mismos.

8. Resultados

Objetivo 1. Obtener los perfiles proteómicos de los plasmas de pacientes con ELA y compararlos con perfiles de individuos clínicamente sanos.

8.1 Población de estudio

Este estudio incluyó un total de 20 pacientes con ELA (11 femeninos y 9 masculinos) los cuales fueron pareados por edad y género con 20 individuos sanos. El rango de edad fue de 30-74 años de edad (Tabla 3). Dos pacientes tuvieron diagnóstico de ELA de inicio temprano, el primer caso a los 30 años de edad, mientras que el segundo a los 36 años, al momento de realización de este estudio.

8.2 Eliminación de proteínas abundantes

Una vez separado el plasma se tomaron 250 μ L y se eliminaron proteínas abundantes en plasma como albumina e inmunoglobulina G (IgG). Para comprobar la eliminación de estas proteínas las muestras procesadas se analizaron en geles SDS-PAGE y se compararon con muestras procesadas con el estuche comercial *QProteome Albumin/IgG Depletion Kit* (QIAGEN). En el gel (Figura 8) se puede observar una disminución en la cantidad de proteínas que corresponden al peso molecular de la albúmina (67 kDa), las cadenas pesadas (50 kDa) y ligeras (25 kDa) de las IgG. En la Figura 8 se observa una disminución de las proteínas abundantes presentes en la muestra, así mismo se observa la presencia de bandas de alto y bajo peso molecular, por lo que la muestra es adecuada para el análisis en 2-DE.

Tabla 3. Pacientes analizados en este estudio.

Paciente	Edad	Género
ELA 1	30	F
ELA 2	45	M
ELA 3	52	F
ELA 4	67	F
ELA 5	48	M
ELA 6	42	F
ELA 7	47	F
ELA 8	59	M
ELA 9	46	F
ELA 10	68	F
ELA 11	50	F
ELA 12	48	M
ELA 13	60	F
ELA 14	40	M
ELA 15	47	F
ELA 16	70	F
ELA 17	43	M
ELA 18	36	M
ELA 19	61	M
ELA 20	55	M

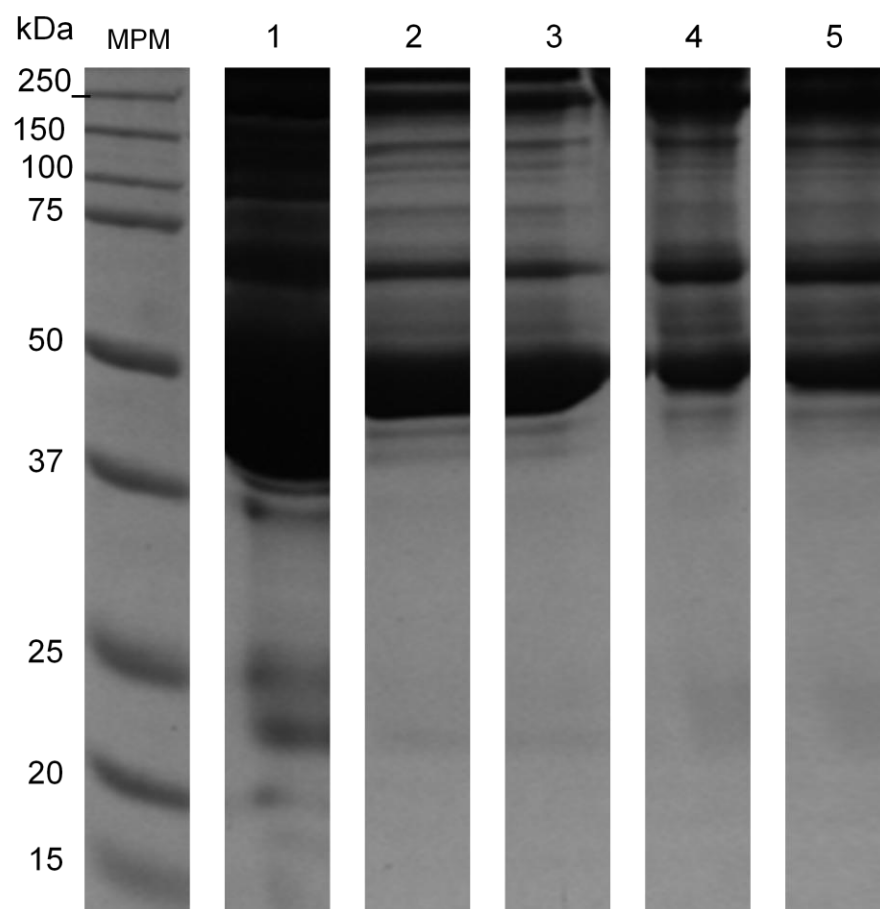


Figura 8. Eliminación de proteínas abundantes en plasmas. Carril 1, el mismo plasma fue cargado en dilución con PBS (1:100). Carriles 2-3, plasmas procesados con el *QProteome Albumin/IgG Depletion Kit*. Carriles 4-5, plasmas procesados mediante las precipitaciones con acetona/TCA.

Posteriormente las muestras fueron procesadas con el estuche *ReadyPrep Cleanup Kit* para concentrar las proteínas y eliminar agentes contaminantes (como lípidos y sales) que interfieran en el isoelectroenfoque. Posteriormente se rehidrataron con solución TUC y fueron sonicadas durante 3 min para solubilizar las proteínas en el amortiguador. Se tomó una alícuota de 20 μ L de la muestra y el resto fue almacenada a -80°C hasta su cuantificación.

8.3 Integridad de proteínas

A partir de la alícuota de 20 μ L tomada en proceso anterior se analizó la integridad de las proteínas mediante SDS-PAGE, seguida de la tinción con azul de Coomassie (Figura 9).

Este análisis se realizó con la finalidad de garantizar el adecuado procesamiento de las proteínas de plasma. Conforme a lo observado en los geles se determinó que la integridad de las proteínas fue adecuada, no se observó degradación de las mismas, se apreciaron bandas nítidas de proteínas de alto y bajo peso molecular, en todas las muestras se observaron patrones de bandas similares y definidos.

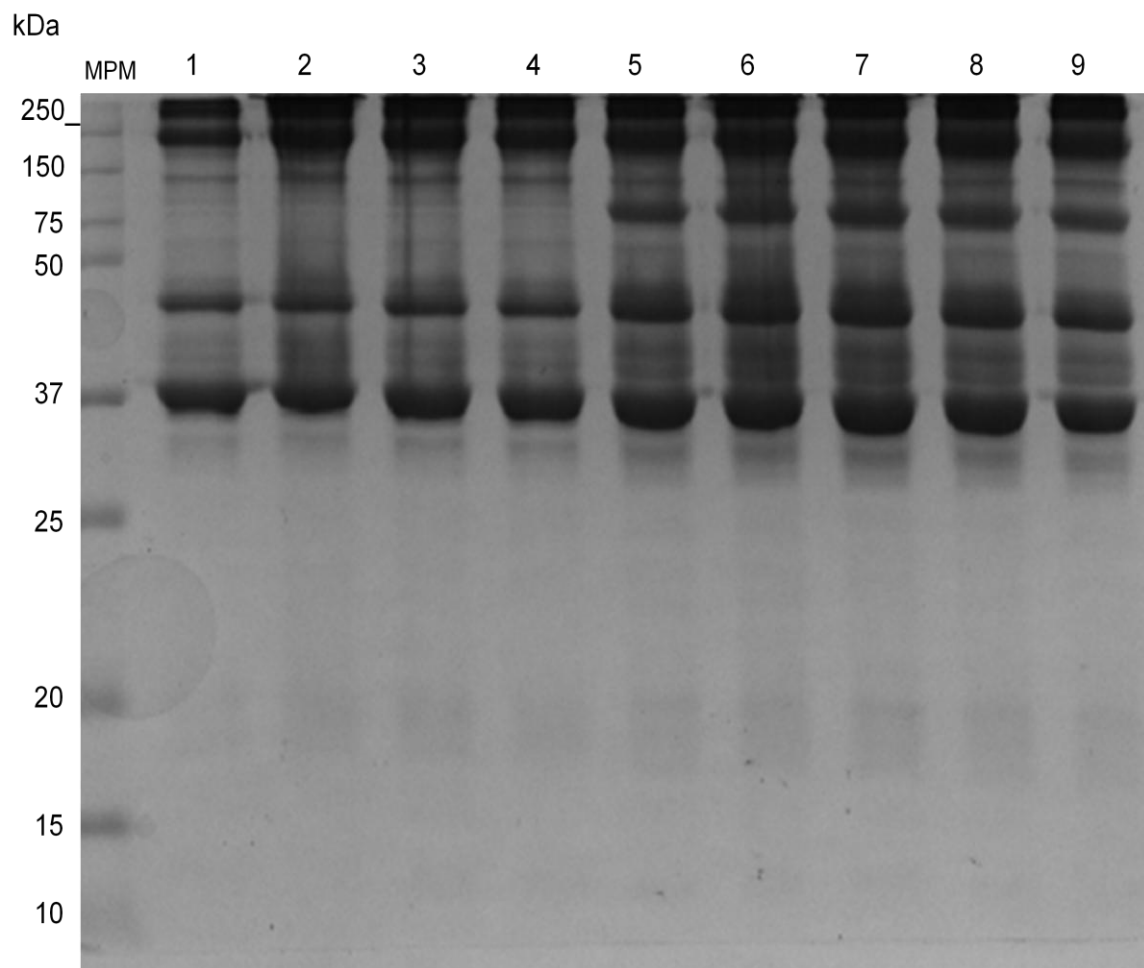


Figura 9. Análisis de integridad de las proteínas de plasma. MPM: marcador de peso molecular. En los carriles 1-5 se presentan muestras procedentes de pacientes con ELA, mientras que en los carriles 6-9 muestras procedentes de controles. SDS-PAGE (10%) teñido con Azul de Coomassie R-250.

8.4 Determinación de actividad proteolítica

La actividad proteolítica de las MMP presentes en el plasma de pacientes y controles fue analizada mediante zimogramas en geles SDS-PAGE copolimerizados con gelatina al 1%. En la Figura 10 se observa que el perfil de la actividad proteolítica es muy similar en todos los casos de ELA, sin embargo se aprecia un incremento en la actividad proteolítica en las muestras de pacientes con respecto a los controles.

En todos las muestras se observaron dos bandas de actividad, una alrededor de los 94 kDa y otra de 72 kDa que corresponden a los pesos moleculares de la MMP-9 y la MMP-2 respectivamente. Además, mediante la adición de EDTA se determinó que la actividad proteolítica observada en el plasma es de enzimas de tipo MMP, ya que el EDTA funge como quelante de calcio, ion metálico que requieren las MMP para su activación y el cual está presente en el amortiguador de activación.

En los zimogramas se determinó que la actividad proteolítica en los plasmas de pacientes con ELA se encuentra incrementada con respecto a los controles, esto debido a que se observaron bandas de actividad más abundantes en el grupo de pacientes (principalmente la banda de 94 kDa, correspondiente a la MMP-9); para confirmar esto la actividad se cuantificó por densitometría (Tabla 4). En el zimograma de un paciente de inicio temprano con un tiempo de evolución de un año, se observó la presencia de una proteasa diferencial (Figura 11).

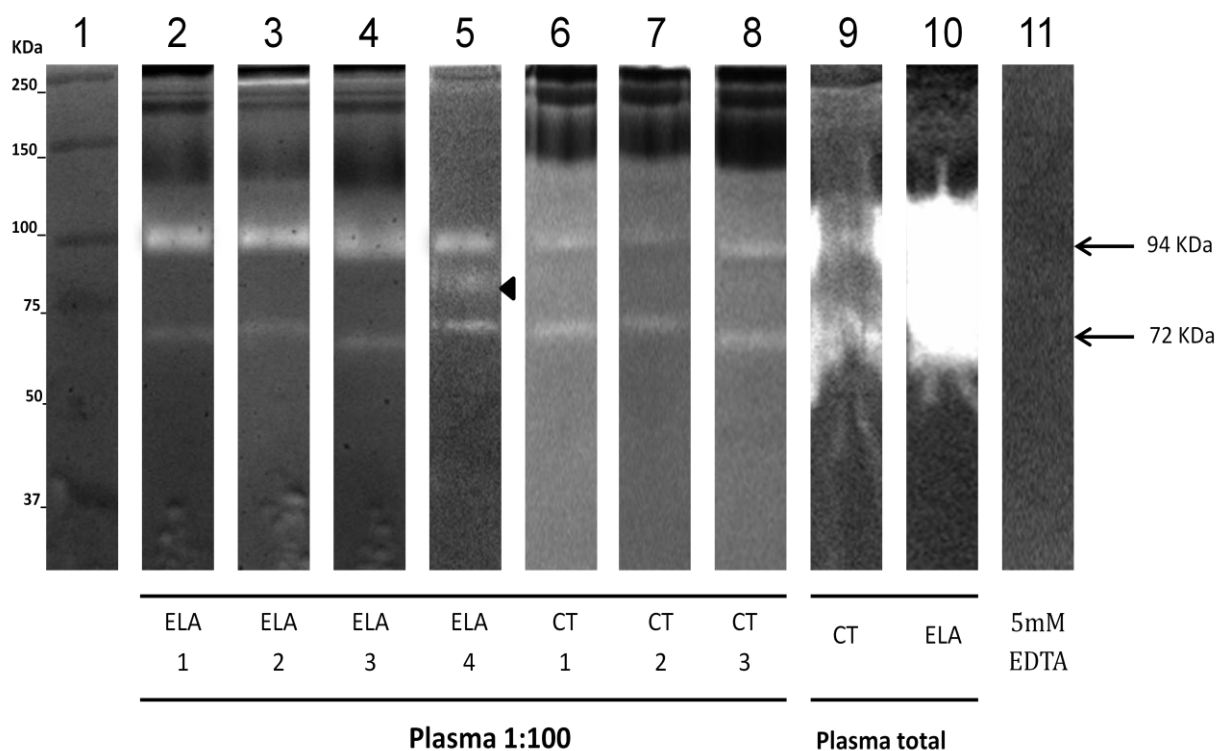


Figura 10. Zimograma de actividad proteolítica del plasma de pacientes con ELA y de controles. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2-5 plasma de pacientes; carriles 6-8 plasma de controles en dilución; carriles 9-10, plasma sin dilución resuelto en el gel; carril 11 muestra de plasma con inhibidor (EDTA) de actividad proteolítica incorporado. LA cabeza de flecha indica una proteasa de actividad diferencial. Las bandas de actividad se aprecian en pesos aproximados a 94 y 72 kDa, correspondientes posiblemente a la MMP-9 y la MMP-2 respectivamente.

Tabla 4. Actividad proteolítica (MMP-9) presente en zimogramas de plasmas.

Muestra	Actividad proteolítica en pacientes	Muestra	Actividad proteolítica en controles
ELA 1	14.436	CT1	9.872
ELA 2	10.092	CT2	9.540
ELA 3	12.256	CT3	9.752
ELA 4	15.396	CT4	9.528
ELA 5	11.632	CT5	9.312
ELA 6	11.220	CT6	8.712
ELA 7	11.156	CT7	8.216
ELA 8	13.892	CT8	8.072
ELA 9	13.960	CT9	8.320
ELA 10	13.324	CT10	9.440
ELA 11	11.032	CT11	9.508
ELA 12	10.856	CT12	9.288
ELA 13	11.324	CT13	9.824
ELA 14	11.296	CT14	9.264
ELA 15	10.896	CT15	9.056
ELA 16	10.472	CT16	8.480
ELA 17	9.004	CT17	8.116
ELA 18	14.520	CT18	8.092
ELA 19	13.436	CT19	9.256
ELA 20	11.092	CT20	9.401

Valores expresados en: Píxeles por $\text{cm}^2/1000$

Posteriormente se realizó un análisis de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución de los datos, en este caso los datos presentaron una distribución no paramétrica por lo que se utilizó una prueba de Mann-Whitney con la finalidad de determinar si existen diferencias entre las medias de ambos grupos.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) entre ambos grupos, por lo que la actividad proteolítica de la MMP-9 es significativamente mayor en pacientes que en individuos sanos, lo que concuerda con lo reportado ya anteriormente por otros grupos, en donde la progresión de la degeneración neuromuscular puede ser dirigida principalmente por este tipo de proteasa.

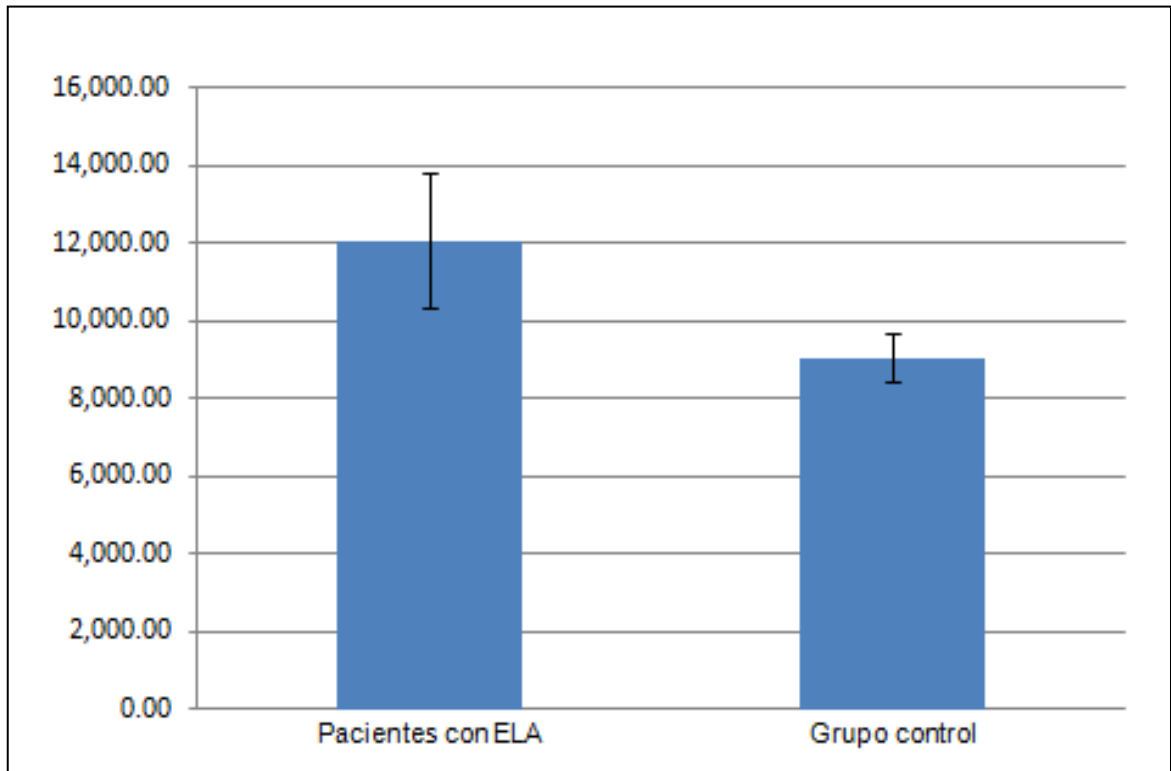


Figura 11. Comparación de actividad proteolítica (MMP-9) en los plasmas de pacientes con ELA y controles.

8.5 Electroforesis bidimensional

El análisis por 2-DE de los plasmas de pacientes y controles con ELA se realizó en gradientes inmovilizados de pH 3-10 para la primera dimensión, la cual consiste en la separación con base a su punto isoeléctrico (pI) por medio de isoelectroenfoque.

Para la separación en segunda dimensión las muestras enfocadas se resolvieron en geles SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 para ser digitalizados. En la Figura 12 se muestra la imagen de un gel en 2-DE del plasma de uno de los casos analizados en este estudio.

Una vez digitalizados los 20 pacientes con su respectivo control, las imágenes se analizaron con el software PDQuest para determinar diferencias entre los proteomas de pacientes y controles, particularmente de proteínas diferencialmente expresadas. Previo al análisis de perfiles, las imágenes tuvieron que ser procesadas para evitar errores al momento de traslapar los geles de pacientes contra controles; las imágenes se cortaron a manera de que tuvieran las mismas dimensiones y de esta manera se justen al momento de hacer la comparación en el software.

Al realizar el análisis diferencial por PDQuest (Figura 13) se determinó la presencia de *spots* diferenciales entre casos y controles.

El análisis diferencial de los geles mostró un promedio de 86 ± 9 *spots* para el grupo control y de 79 ± 12 *spots* (promedio) para el grupo de pacientes, presentando el 91.8% de *spots* similares identificados. En la Tabla 5 se presenta el número promedio de *spots*. En promedio, 62 ± 16 *spots* hicieron match entre ambos grupos y de estos 37 ± 11 fueron diferenciales. De los 37 *spots* en el grupo de casos y los controles se seleccionaron 14 *spots* que se observaron diferenciales ($\uparrow 5$ y $\downarrow 9$) de forma consistente en los plasmas de los pacientes con ELA (Figura 14).

Debido a la resolución variable obtenida de los *spots* en cada muestra, se obtuvieron conteos variables de los *spots*. Esta característica puede atribuirse a que en la ELA, al igual que otras EN, presenta una expresividad variable que puede conferir diferencias no solo en la presentación clínica, sino también en el aspecto molecular (Shawky, 2014).

En la Figura 15 se presenta un panel representativo de los proteomas del plasma de pacientes con ELA pareados con sus respectivos controles.

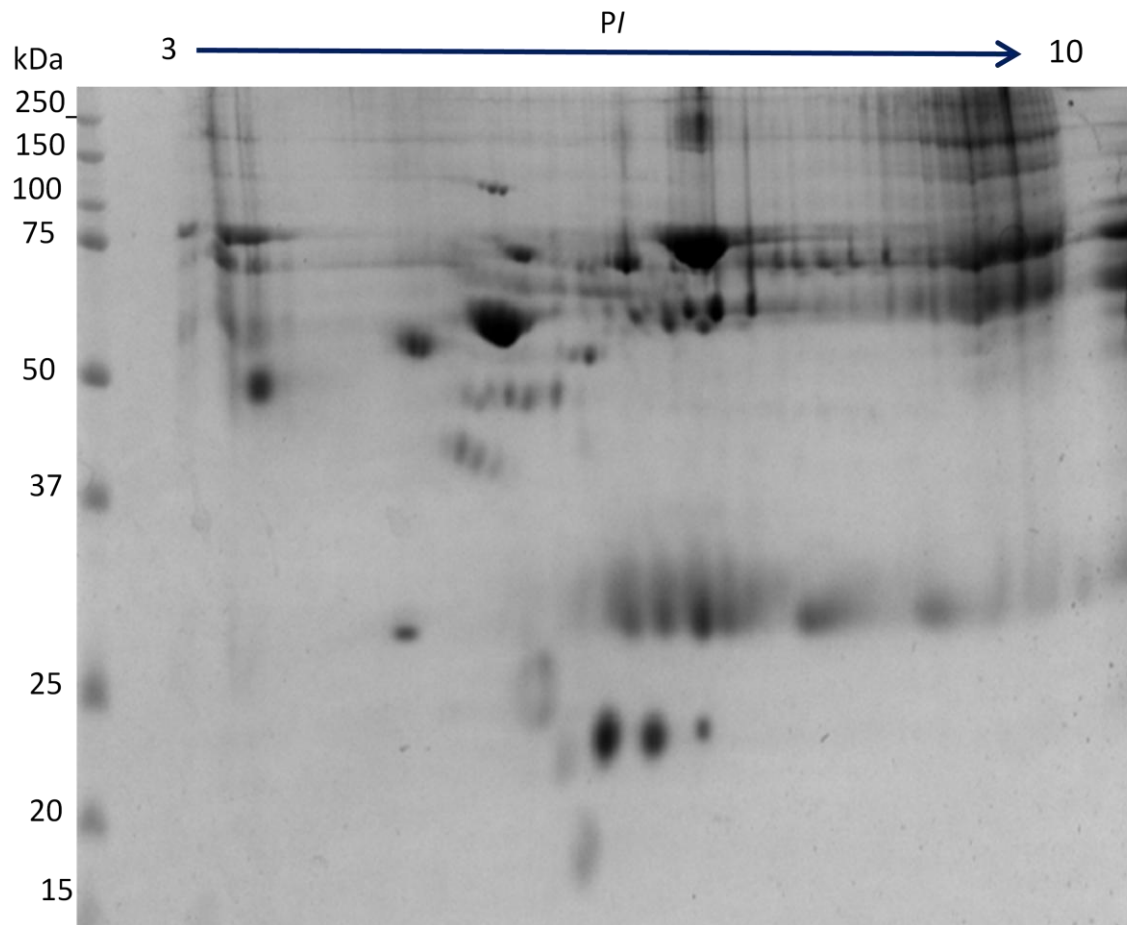


Figura 12. Gel 2-DE representativo del plasma de pacientes con ELA. En la imagen se observan proteínas con un punto isoeléctrico (P/I) entre 3-10, además con peso molecular que va desde los 150 a los 15 Kilodaltones (kDa).

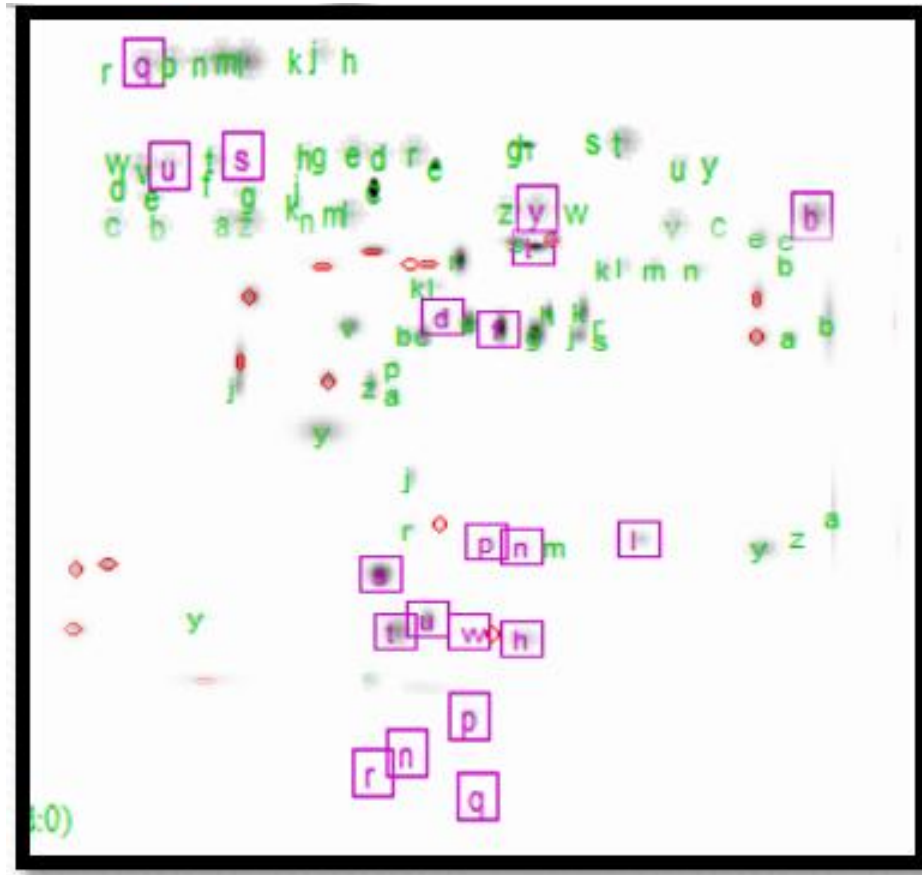


Figura 13. Gel maestro de casos y controles. Análisis diferencial por PDQuest de gel 2-DE de 7 cm con rango de pH 3-10. Los *spots* marcados en letras rojas indican que no hay cambios significativos en la expresión de la proteína entre casos y controles. Los cuadros de color azul indican las proteínas que disminuyen o aumentan 2 o más veces su expresión con respecto al grupo control.

Tabla 5. Numero de spots promedio obtenidos por grupo.

<i>Spots</i>	Pacientes	Controles
Spots totales	79±12	86±9
Match	62±16	
Diferenciales	37±11	

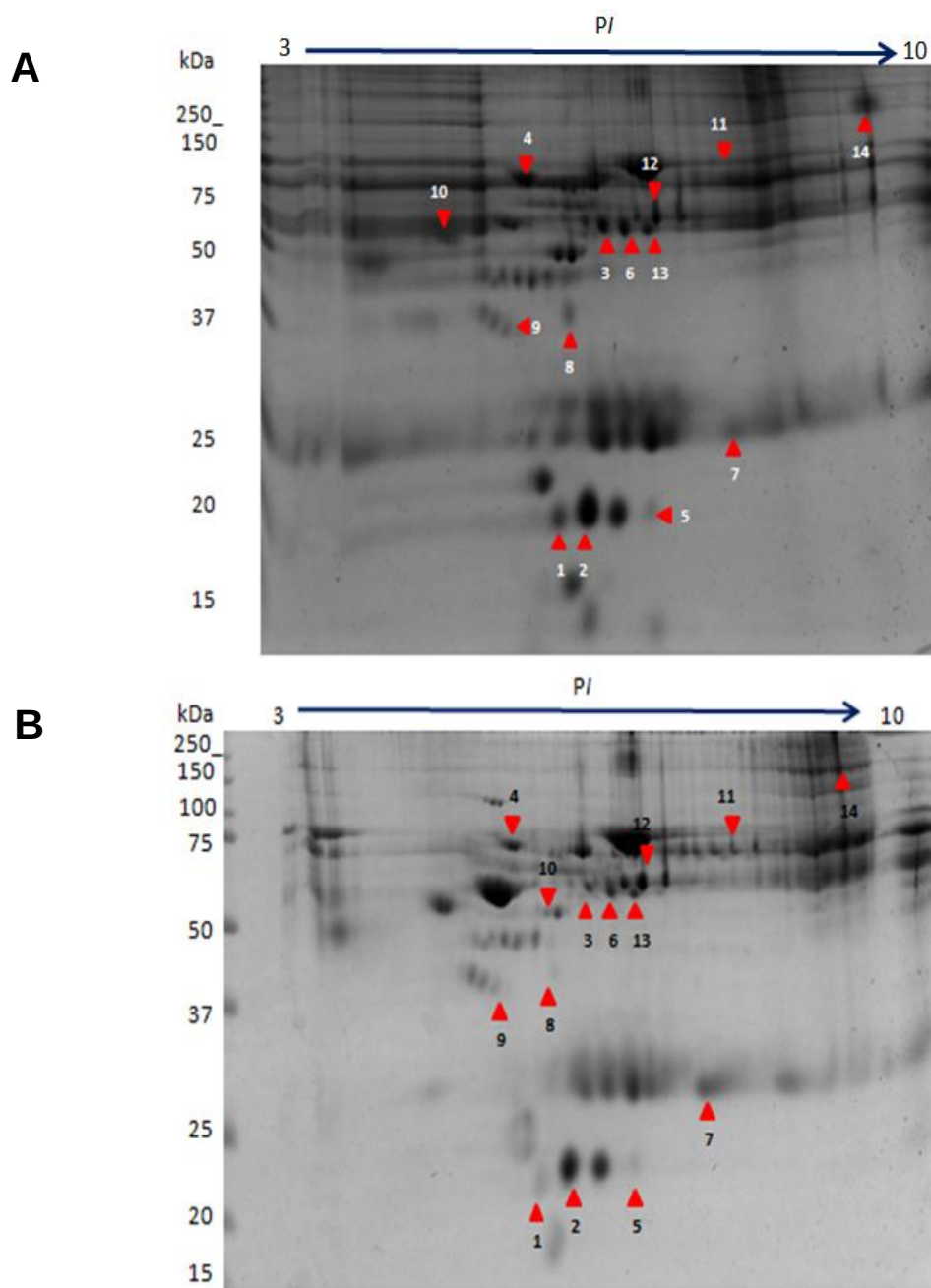


Figura 14. Geles representativos donde se muestran los *spots* diferencialmente expresados (señalados con cabeza de flecha roja) entre controles (A) y pacientes (B). Los *spots* fueron identificados por MALDI-TOF.

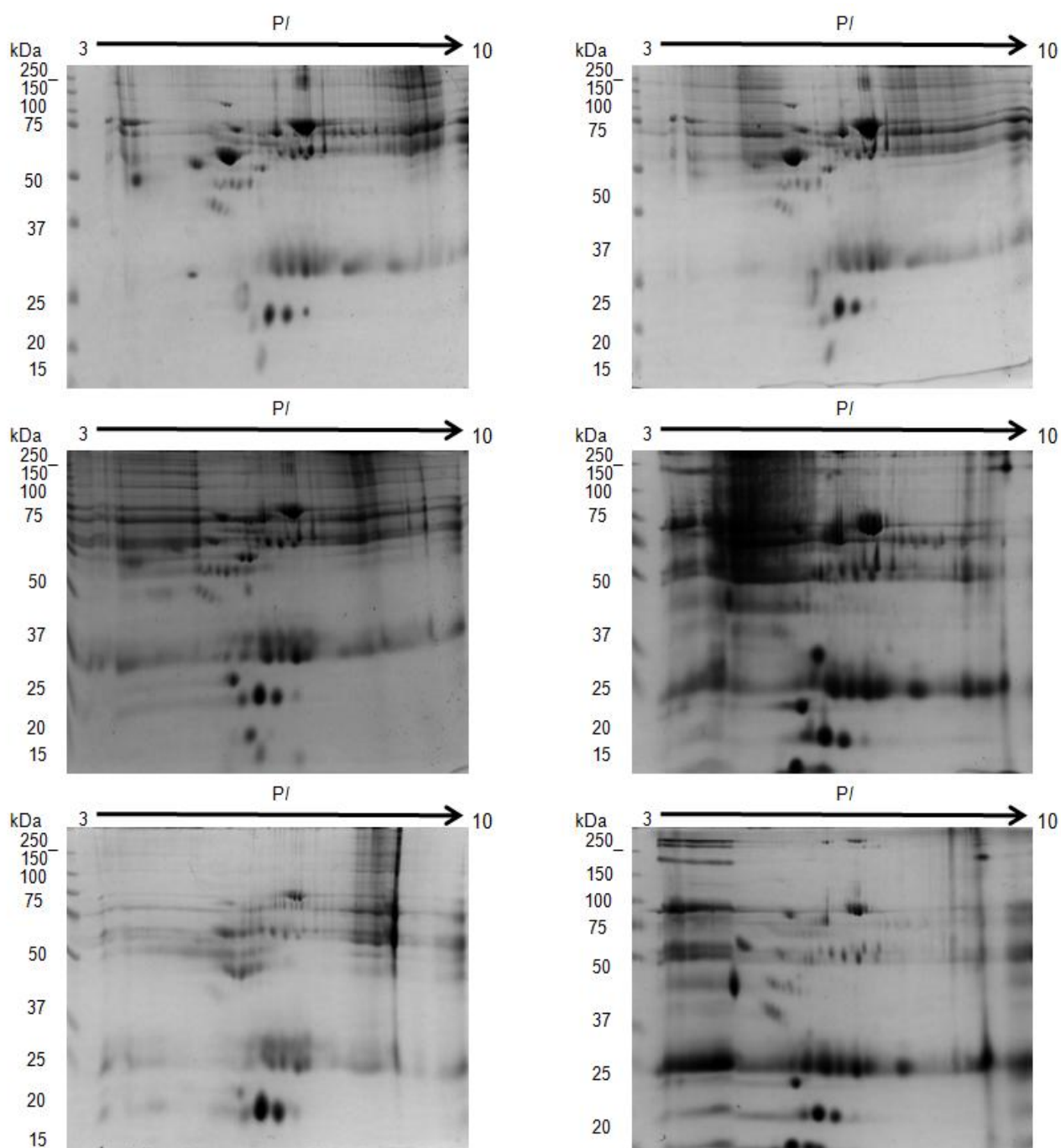


Figura 15. Comparación entre perfiles proteómicos de plasmas de pacientes con ELA (lado izquierdo) y controles (lado derecho).

Objetivo 2. Identificar las proteínas diferencialmente expresadas en la ELA.

8.6 Identificación de proteínas por MS

Los 14 *spots* diferenciales fueron seleccionados para su identificación. A partir de la relación m/v de los péptidos obtenidos mediante MS, se identificaron las 14 proteínas seleccionados de los análisis comparativos del perfil proteómico del plasma de pacientes con ELA. De las proteínas identificadas se obtuvieron porcentajes de cobertura que van de 20.1% a 64.6%. Las proteínas identificadas presentaban funciones moleculares relacionadas principalmente con la inflamación, mantenimiento de MEC, regulación de la actividad proteolítica, transporte de moléculas (como otras proteínas o lípidos), regulación de apoptosis, respuesta antioxidante y procesamiento de proteínas (Tabla 6).

Cuatro de las 14 proteínas identificadas de ellas (serpina-1, clusterína, proteína asociada a núcleo accumbens y la ankirina-1) han sido poco caracterizadas o no reportadas en el plasma de pacientes con ELA. La proteína asociada a núcleo accumbens y la clusterina son proteínas que se localizan y ejercen su función fisiológica principalmente en SNC, cabe destacar que también se encontraron en el plasma de individuos sanos, sin embargo, en condiciones fisiológicas normales sus niveles (abundancia) son casi indetectables.

Tabla 6. Proteínas identificadas en el plasma de pacientes con ELA.

No. de spot	Proteína	No. de acceso (UNIPROT)	Expresión	Masa (kDa)	pI	Cobertura (%)	Longitud (a.a.)	Gen	Locus	Función molecular
1	Haptoglobina	P00738	↓	8-200	4.03-4.24	40.9	406	<i>HP</i>	16q22.2	Antioxidante, unión a hemoglobina
2	Transtiretina	P02766	↑	15.88	4.6-4.95	32.7	147	<i>TTR</i>	18q12.1	Transporte de hormonas, degranulación de neutrófilos
3	Receptor Scavenger clase A miembro 5	Q6ZMJ2	↓	53.99	6.0-6.1	64.6	495	<i>SCARA5</i>	8p21.1	Receptor con actividad de ferritina y scavenger, transporte de iones
4	Proteína potenciadora tipo transducina	Q04726	↓	83.41	4.2-4.4	43.2	772	<i>TLE3</i>	15q23	Organogénesis, regulación transcripcional, transducción de señales
5	Proteína de unión a retinol	P02753	↓	23.01	4.4-4.7	20.1	201	<i>RBP4</i>	10q23.33	Heterodimerización de proteínas, Secreción de Ig, transporte molecular
6	Acil- CoA sintetasa	Q08AH1	↓	65.27	4.5-4.9	60.7	557	<i>ACSM1</i>	16p12.3	Metabolismo de acil-CoA, lípidos y xenobioticos; unión de iones
7	Apolipoproteína-A1	P02647	↑	30.77	5.27-5.56	34.5	276	<i>APOA1</i>	11q23.3	Unión a β-amiloide y neurotransmisores, transporte lipídico, proteína de choque térmico, inhibidor de lipasas
8	Serpina-1 (Antitripsina-α1)	P01009	↓	46.73	4.2-4.65	51.9	418	<i>SERPINA1</i>	14q32.13	Unión a proteasas, inhibición de actividad de serín endopeptidasas
9	Fetúina-A	P02765	↓	39.32	3.3-3.5	51.9	367	<i>AHSG</i>	3q27.3	Inhibidor de cisteín endopeptidasas y cinasas
10	Clusterina	P10909	↑	52.5	3.6-3.8	30.3	449	<i>CLU</i>	8p21.1	Unión a β-amiloide, activación microglial, regulación muerte neuronal
11	Proteína asociada a núcleo accumbens	Q96RE7	↑	57.26	5.2-5.5	36.1	527	<i>NACC1</i>	19p13.13	Factor de transcripción, promueve apoptosis
12	Glicoproteína-α1B	P04217	↑	54.25	5.47-5.8	39.0	495	<i>A1BG</i>	19q13.43	Degranulación de neutrófilos y plaquetas
13	Fibrogénico	P02675	↑	55.92	5.5-5.8	34.4	491	<i>FGB</i>	4q31.3	Degranulación de neutrófilos y plaquetas, mantenimiento de MEC, respuesta a IL-1
14	Ankirina-1	P16157	↓	206.26	6.9-7.2	44.2	1881	<i>ANK1</i>	8p11.21	Componente estructural de citoesqueleto, axolema y de membrana postsináptica; proyección neuronal y

Objetivo 3. Predecir el posible mecanismo patológico en el que participan las proteínas diferencialmente expresadas.

8.7 Análisis *in silico* de funciones biológicas y categorización funcional

Las proteínas identificadas fueron posteriormente analizadas con la base de datos DAVID, para esto se emplearon las funciones de ontología de genes y anotación funcional. Las proteínas se clasificaron de acuerdo a su función, localización celular, actividad biológica y la posible implicación que tendría la proteína durante la patología.

Para la primera categorización las proteínas se agruparon conforme a su localización celular (Figura 16) y se pudo observar que el 47% (n=14) de ellas son extracelulares/secretadas, 16% (n=14) nucleares, 11% (n=14) mitocondriales y en retículo endoplásmico (RE) y 1% (n=14) en citosol, citoesqueleto y membranales.

La segunda categorización de proteínas consistió en un agrupamiento conforme a su función biológica (Figura 17). Dentro de las funciones biológicas que realizan las proteínas identificadas se encuentran principalmente las relacionadas a la respuesta inmune (26%), el metabolismo de biomoléculas como lípidos y otras proteínas (15%), proteínas de fase aguda (15%), regulación de la apoptosis (11%), mantenimiento de sistema nervioso (11%), transducción de señales (8%), regulación del desarrollo embrionario (7%) y como reguladoras transcripcionales (7%). Por lo que la alteración (en su abundancia) resultaría en el desencadenamiento de algún proceso crónico que podría desencadenar una patología.

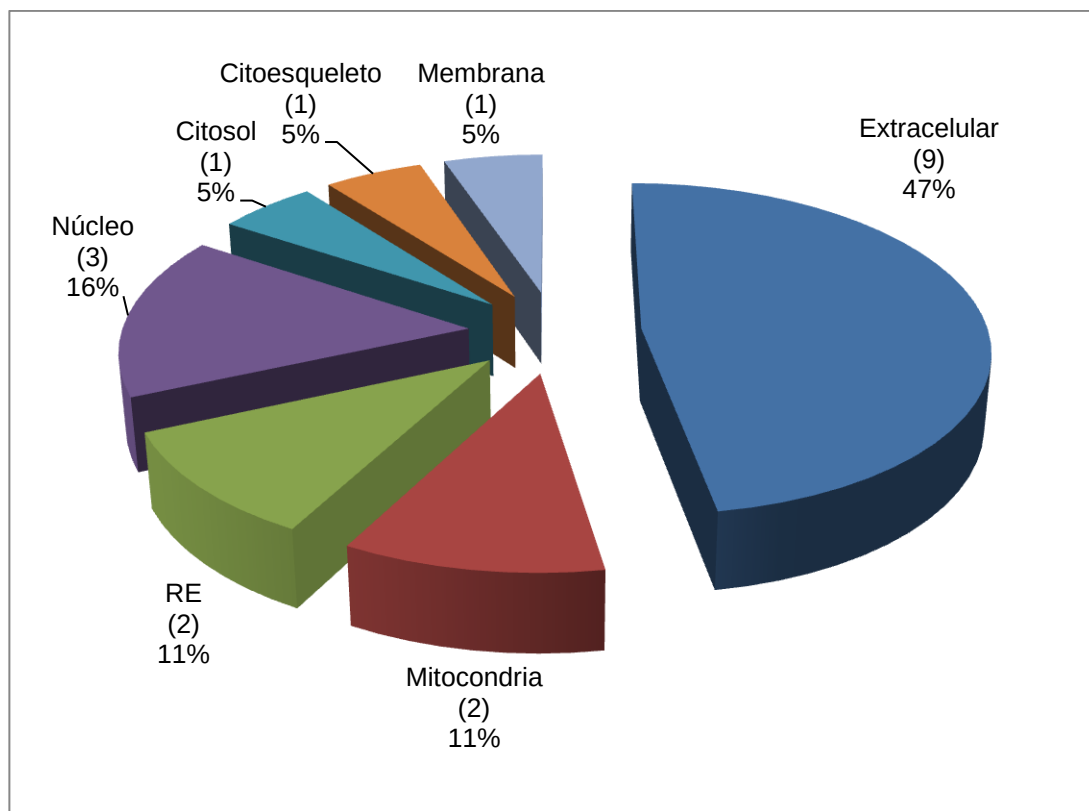


Figura 16. Localización celular de las proteínas desreguladas en plasma de pacientes con ELA. Se muestra el número de proteínas para cada caso así como el porcentaje. RE: retículo endoplásmico.

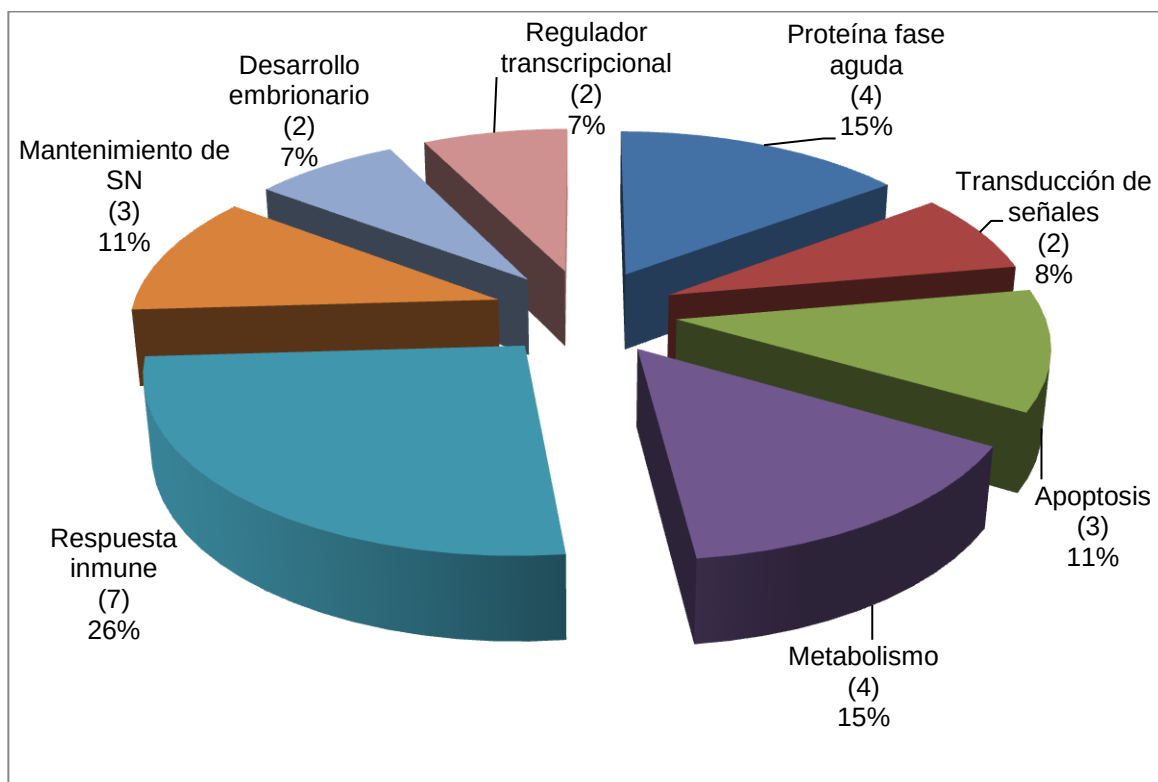


Figura 17. Funciones biológicas de las proteínas desreguladas en el plasma de pacientes con ELA. Se muestra el número de proteínas para cada caso así como el porcentaje.

La última clasificación de las proteínas identificadas en este estudio consistió en determinar su posible participación en la patología de la ELA (Figura 18). Para esto, en el análisis por DAVID se incluyeron características de anotación funcional que integran información de diversas bases de datos sobre patologías en humanos, como por ejemplo, la base *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM). Una vez que se analizaron los datos, las predicciones se agruparon conforme a las alteraciones moleculares descritas en la literatura sobre las manifestaciones clínicas de la ELA. Dentro de las alteraciones en las que pudieran estar participando las proteínas identificadas se encuentran principalmente la desregulación génica (19%), la neuroinflamación (19%), la activación de la glía (14%), la desregulación de la actividad proteolítica (14%), la agregación de proteínas (14%), la detoxificación celular (11%) y el metabolismo de lípidos (10%).

Los resultados obtenidos en el análisis *in silico* demuestran que las proteínas desreguladas en el plasma de los pacientes con ELA pueden estar participando en diversos procesos que anteceden a la neurodegeneración, dentro de estos procesos destaca, por ejemplo, la neuroinflamación, la agregación de proteínas y la activación de la glía.

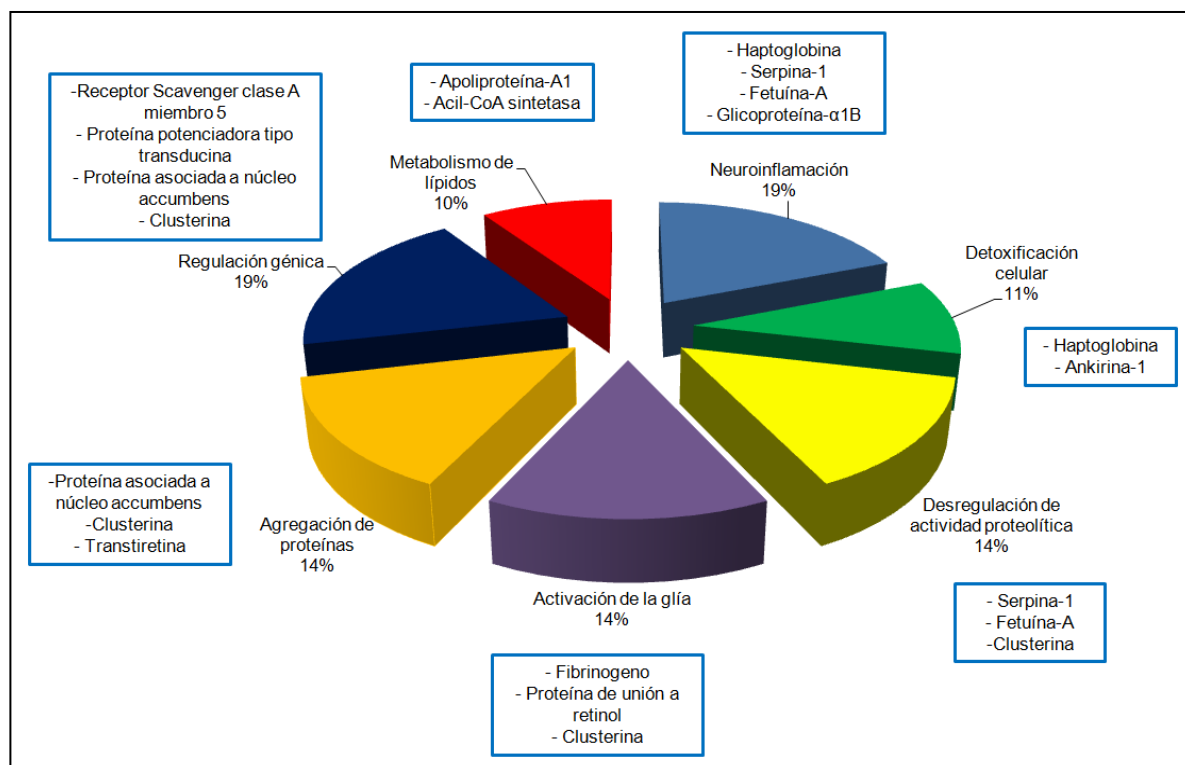


Figura 18. Procesos biológicos en los que participan las proteínas desreguladas en el plasma de pacientes con ELA.

Objetivo 4. Evaluar una correlación entre las proteínas desreguladas y las manifestaciones clínicas del paciente.

8.8 Características clínicas de pacientes

Dentro de las características clínicas que se consideraron para este análisis (Tabla 7) se tomó en cuenta la forma de ELA (la región neuroanatómica afectada al inicio de la enfermedad), la edad de inicio, el tiempo de evolución (expresado en meses), el puntaje obtenido en la ALSFRS-R, el índice de Kimura (el cual mide la evolución, clasificándolo como lento o rápido) y finalmente se incluyó también el tipo de ELA de la que se trataba (típica, atípica, de inicio temprano o con demencia).

En nuestra cohorte de pacientes había dos pacientes de inicio temprano los cuales presentaron una ELA de tipo Braquial y Vulpian, esta última es una variante rara de la ELA y se caracteriza por una atrofia de extremidades superiores, generalmente la degeneración neuromuscular comienza en cintura escapular; se presentó también un paciente con una ELA de tipo Crural agresiva con demencia, esta forma puede traslapar su cuadro clínico debido al espectro ELA-DFT.

Para determinar si existe alguna correlación entre la actividad proteolítica y los datos clínicos de los pacientes se realizó un análisis de correlación de Spearman entre los datos de la actividad proteolítica contra la ALSFRS-R y el índice de Kimura.

Para la actividad de la MMP-9 contra la ALSFRS-R se obtuvo un coeficiente de correlación de -0.326, por lo que mientras una de las variables aumenta (actividad proteolítica) la otra variable disminuye (funcionalidad), lo que indica que conforme la actividad proteolítica es mayor la funcionalidad del paciente irá en deterioro. La Figura 19 muestra la dispersión de los datos de manera gráfica.

Por otro lado, con respecto a la actividad de la MMP-9 contra el índice de Kimura, se presentó una correlación de 0.174 lo cual implica que conforme la actividad proteolítica aumenta la evolución de la enfermedad también progresará. De igual forma la Figura 20 muestra la dispersión de los datos de manera gráfica.

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes analizados.

PACIENTE	FORMA	EDAD INICIO	EVOLUCION	ALSFRS-R	INDICE KIMURA	PROGRESION	OBSERVACIONES
ELA 1	BRAQUIAL	29	24	33	0.62	MODERADA	INICIO TEMPRANO
ELA 2	BRAQUIAL	45	26	40	0.3	LENTA	TIPICA
ELA 3	BULBAR	52	13	31	1.3	RAPIDA	TIPICA
ELA 4	VULPIAN	67	23	32.5	0.65	MODERADA	ATIPICA
ELA 5	BRAQUIAL	48	7	44	0.57	LENTA	TIPICA
ELA 6	BRAQUIAL	42	9	42	0.66	MODERADA	TIPICA
ELA 7	BRAQUIAL	47	12	43	0.41	LENTA	TIPICA
ELA 8	CRURAL	59	19	33	0.78	RAPIDA	AGRESIVA CON DEMENCIA
ELA 9	BULBAR	46	11	37	1	RAPIDA	TIPICA
ELA 10	BULBAR	68	29	21	0.93	RAPIDA	TIPICA
ELA 11	CRURAL	50	24	22.5	1.06	RAPIDA	TIPICA
ELA 12	BRAQUIAL	48	14	40	0.57	LENTA	TIPICA
ELA 13	BULBAR	60	29	44	0.14	LENTA	TIPICA
ELA 14	BRAQUIAL	40	46	14.5	0.73	RAPIDA	TIPICA
ELA 15	BULBAR	47	11	36.5	1.05	RAPIDA	TIPICA
ELA 16	BULBAR	70	29	21	0.93	RAPIDA	TIPICA
ELA 17	BRAQUIAL	43	36	45.5	0.07	LENTA	TIPICA
ELA 18	VULPIAN	35	12	6	0.62	RAPIDA	INICIO TEMPRANO
ELA 19	BRAQUIAL	60	24	17	0.65	MODERADA	TIPICA
ELA 20	BRAQUIAL	56	22	31	0.66	LENTA	TIPICA

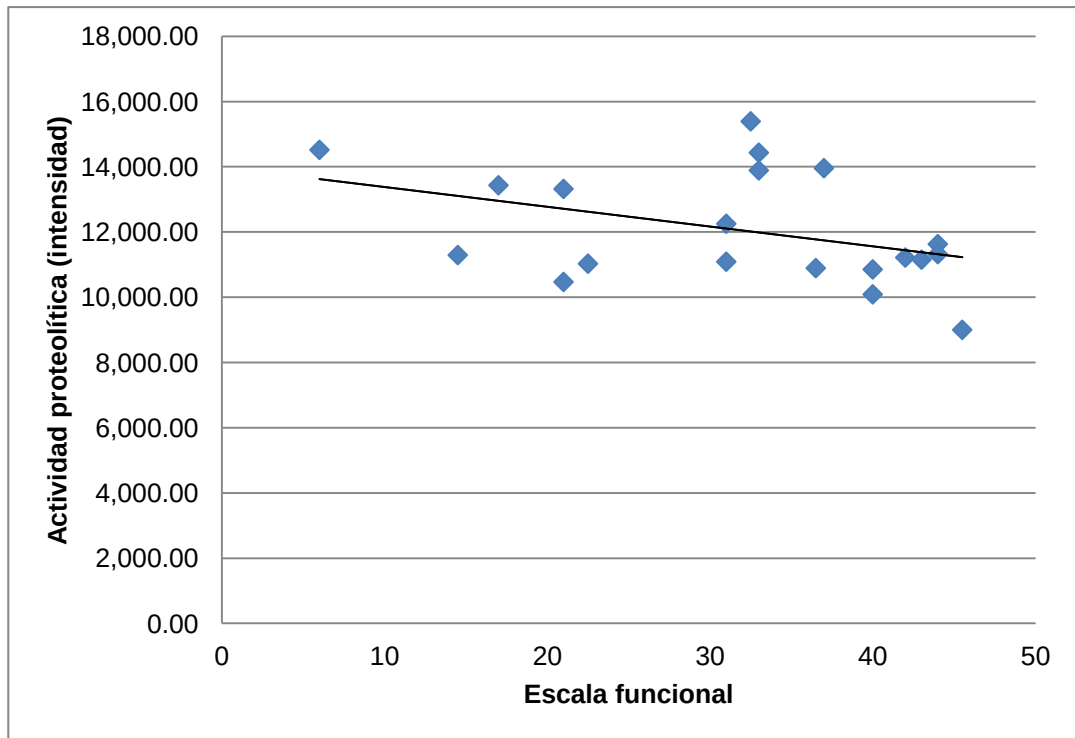


Figura 19. Grafico de relación entre la actividad proteolítica de la MMP-9 y la ALSFRS-R.

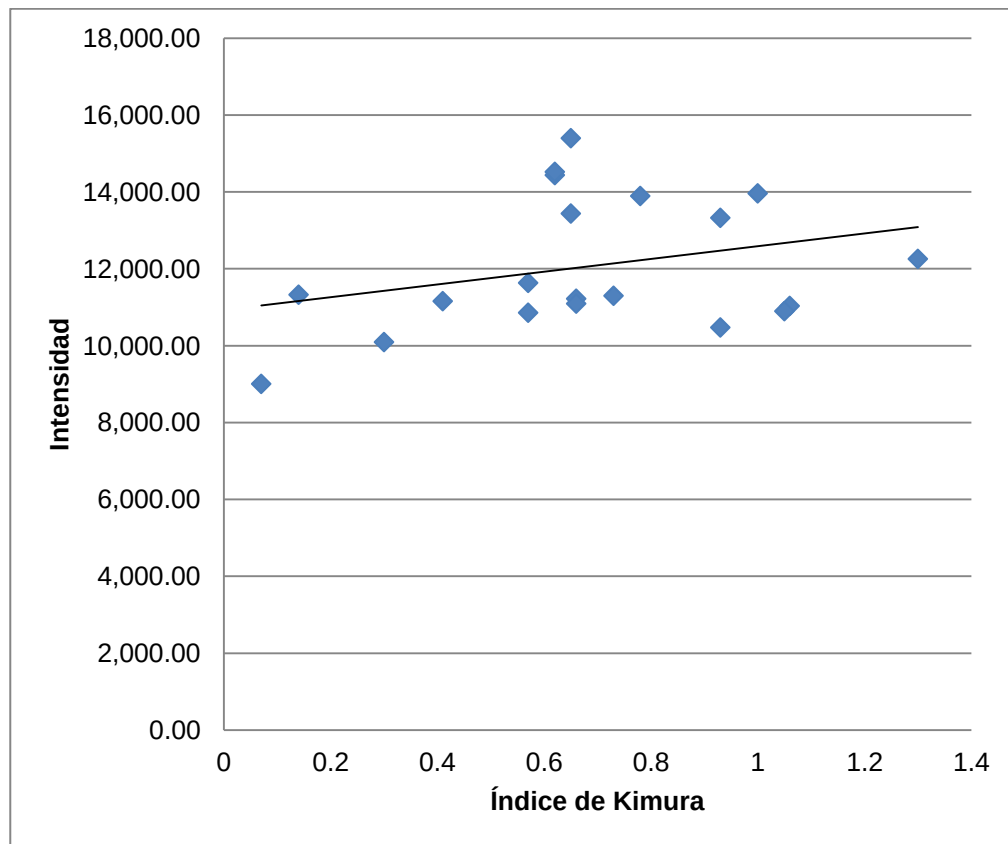


Figura 20. Grafico de relación entre la actividad proteolítica de la MMP-9 y el índice de Kimura.

Con respecto a las proteínas identificadas como diferenciales, se analizó el posible papel patológico en alguno de los procesos patogénicos ya descritos en la ELA. Se analizaron principalmente las proteínas poco estudiadas en la ELA. Las proteínas y los procesos involucrados se enlistan en la Tabla 8, de los cuales destacan la exacerbación de la actividad proteolítica (principalmente de MMP), neuroinflamación, la inducción a apoptosis, el aumento de radicales libres así como agregados intracelulares de origen proteico, la desestabilización del citoesqueleto y de neurofilamentos, los errores en sinapsis (recaptura de neurotransmisores y errores en el transporte de vesículas sinápticas) y destrucción axonal.

Tabla 8. Proteínas involucradas en el desarrollo de la ELA.

Proteína	Participación en ELA
Serpina-1	Desregulación de la actividad proteolítica, inflamación, axotomía, degeneración neuromuscular
Proteína asociada a núcleo accumbens	Inducción de apoptosis neuronal, activación de la glía, neuroinflamación
Ankirina-1	Formación de agregados intracelulares tóxicos, desestabilización del citoesqueleto, destrucción de neurofilamentos
Clusterina	Formación de placas amiloideas, desarrollo de demencia, desestabilización de citoesqueleto, errores en sinapsis , destrucción axonal

9. Discusión

Las estrategias de la neuroproteómica consisten principalmente en el análisis de la expresión proteómica, el monitoreo global de la expresión de un gran número de proteínas en un tipo celular, tejido o biofluido e identificar como los patrones de expresión cambian bajo diversas circunstancias. De esta forma la aplicación de la proteómica en estudios de EN resulta en una poderosa aproximación para una comprensión mejor del proceso patológico y por ende la identificación de marcadores moleculares de la misma. La ELA está dentro de los trastornos neurodegenerativos más devastadores en donde los biomarcadores de la enfermedad son particularmente necesarios (Sheta *et al.*, 2006).

Este tipo de estudios se ha caracterizado ampliamente el proteoma de individuos con ELA a nivel de LCR (Ryberg *et al.*, 2010; Barschke *et al.*, 2017), sin embargo, el análisis proteómico del plasma sanguíneo ha sido poco abordado.

En este estudio, el análisis proteómico del plasma de 20 pacientes referidos con diagnóstico clínico de ELA, reveló la presencia de proteínas con diferente abundancia con respecto al plasma de individuos sanos. Dicho análisis permitió la identificación de 14 proteínas, algunas previamente descritas como desreguladas en la ELA, así como su caracterización en cuanto a su participación en la patología y en algunos casos propuestas como biomarcadores, dentro de estas se encuentran la haptoglobina (Fröhlander & Forsgren, 1988), la transtiretina (Ranganathan *et al.*, 2009), el receptor Scavenger clase A miembro 5 (Zhao *et al.*, 2013), la proteína potenciadora de tipo transducina (Yu *et al.*, 2013), la proteína de unión a retinol (Kolarcik & Bowser, 2012; Riancho *et al.*, 2015), la acil-CoA sintetasa (Ellis *et al.*, 2013; Tefera & Borges, 2017), la apolipoproteína-A1 (Giudice *et al.*, 2014; Mariosa *et al.*, 2017), la glicoproteína- α 1B (Riva *et al.*, 2016), el fibrinógeno (Bai *et al.*, 2009) y la fetuína (Bowser *et al.*, 2011). Por otro lado, el resto de las proteínas identificadas (4) han sido poco estudiadas o de reciente descripción con respecto a su desregulación en la ELA, en este caso, la clusterina, que recientemente se publicó su posible utilidad como biomarcador en ELA a partir de plasma (Xu *et al.*, 2017) y la serpina-1, que se ha demostrado su desregulación en tanto en plasma como en LCR (Wormser *et al.*, 2016); a pesar de contar con reportes previos en pacientes con ELA, los estudios al respecto son pocos.

Para el caso de la proteína asociada a núcleo accumbens y la ankirina-1 no existen trabajos previos que reporten su desregulación en plasma o LCR de pacientes con ELA, por lo cual su relación con la enfermedad aún no ha sido determinada.

Con respecto a las cuatro proteínas anteriormente mencionadas, su desregulación a nivel del plasma puede estar implicando un cambio fenotípico que incluya un cuadro clínico característico. La serpina-1, también conocida como alfa antitripsina 1, es una proteína inhibidora de proteasas, esta es codificada por el gen *SERPINA-1* en humano. En este estudio esta proteína se presentó con una abundancia menor en pacientes, en otros estudios se ha reportado de igual forma su desregulación (Silverman & Sandhaus, 2009; Wormser *et al.*, 2016), reportando que una abundancia menor de esta proteína conlleva a estadios patológicos comprometiendo la funcionalidad de diversos órganos y tejidos. La alteración en la homeostasis de esta proteína resulta generalmente en daño a tejidos, provocado por desregulación de la actividad proteolítica e inflamación, esto último también relacionado con la serpina-1 que actúa en conjunto con las proteínas reactantes de fase aguda, modulando su actividad (Lussier & Wilson, 2016), al tener una abundancia menor de serpina-1, las proteínas mediadoras de inflamación aumentan su actividad y se produce daño celular/tisular, en los pacientes con ELA, conllevando posiblemente a neuroinflamación, neurodegeneración y degeneración muscular. La desregulación de esta proteína conlleva generalmente a afecciones pulmonares severas, interesantemente esto correlaciona con los estadios finales de los pacientes con ELA, los cuales generalmente mueren por fallas respiratorias provocadas por una deficiencia de serpina-1 en torrente sanguíneo, lo cual ocasiona daño en las paredes alveolares (Fahy *et al.*, 2006; Reniers *et al.*, 2017).

La clusterina, es una proteína también conocida como apolipoproteína J, se encuentra principalmente en biofluidos, y el sistema nervioso (neuronas motoras, neuronas pontobulbares y astrocitos), su función es fungir como chaperona. En este estudio, la clusterina se encontró elevada en el plasma de pacientes con ELA, lo que concuerda con estudios previos sobre el papel de esta proteína en enfermedad de neurona motora, donde reportan que en condiciones de estrés celular o de patología su expresión se encuentra elevada, por lo cual se considera una proteína de estrés. Además del procesamiento de otras proteínas, la clusterina también ha sido relacionada con procesos de activación de la glía y regulación de muerte celular, por lo

que durante la inducción de apoptosis funge como antagonista de la proteína Bax, previniendo la liberación de citocromo C mitocondrial y por ende, la activación de caspasas, por lo que en ELA, esta proteína posiblemente promueve la apoptosis de neuronas motoras. El incremento en la abundancia de la misma podría contribuir al proceso de neurodegeneración, además, al encontrarse con mayor abundancia esta genera errores en el proceso de maduración de otras proteínas, por ejemplo, otras apolipoproteínas (acumulándose intracelularmente y resultando tóxicas para las neuronas) y proteasas (desregulando la actividad proteolítica), contribuyendo así a la aparición de manifestaciones clínicas características de la ELA (Zinkie *et al.*, 2013).

Por otro lado, la ankirina-1 es una proteína que une a las proteínas de membrana con la actina/ β -espectrina del citoesqueleto celular, además de ser una de los principales componentes de éste. La ankirina-1 se expresa en diversos órganos, pero se encuentra principalmente en cerebro, corazón y músculo esquelético. Esta proteína adaptadora participa principalmente en la formación de complejos proteicos que conforman canales y transportadores que incluyen a los canales de sodio/calcio dependientes de voltaje en neuronas. Esta proteína mostró una abundancia disminuida en el plasma de pacientes con ELA y aunque aún no existen estudios que la relacionen con la enfermedad, si se ha encontrado desregulada en pacientes con ELA, sin embargo, al contrario de lo encontrado en este estudio su expresión se encuentra incrementada en cerebros de individuos con ELA; dicha diferencia en la abundancia de la proteína puede deberse al tipo de muestra ya que el cerebro es uno de los principales órganos que la expresan, por otro lado, en el plasma sanguíneo no es tan abundante. Interesantemente, la ankirina ha sido relacionada con un gran número de patologías, entre ellas la ELA. Se ha observado que cambios en la expresión de esta proteína en el soma y dendritas de células de Purkinje y células granulosas de cerebelo se relaciona con algunos trastornos de movimiento (que pueden estar presentes en enfermedad de neurona motora). La desregulación de esta proteína también se ha asociado a cambios de humor, episodios de manía y depresión (muy frecuente en pacientes con ELA), lo anterior se debe principalmente a que al desregularse la expresión de ankirina se modifica la conectividad sináptica y los circuitos neuronales, esto consiste en pérdida de sinápsis entre interneuronas y células de Purkinje en cerebros deficientes de ankirina, como es el caso de lo observado en este estudio. Estos cambios en la expresión de la proteína también resultan en errores de circuitos

neuronales donde están involucrados algunos neurotransmisores como serotonina, dopamina, acetilcolina y GABA (ácido gamma aminobutírico). Específicamente la pérdida de la expresión de ankirina conlleva a una retracción de botones presinápticos (causados por una desestabilización del citoesqueleto), disrupción de algunos canales dependientes de voltaje y finalmente neurodegeneración (Cunha & Mohler, 2009; Wang *et al.*, 2006; D'Arrigo *et al.*, 2010).

En relación a la proteína asociada núcleo accumbens, ésta es una proteína con motivos de dedos de zinc que promueve la proliferación celular, apoptosis, control transcripcional y el mantenimiento de la morfología celular (Sekine *et al.*, 2015). Esta proteína se expresa principalmente en cerebro, particularmente en el núcleo accumbens, área relacionada con el sistema de recompensa y con las adicciones. En este trabajo la proteína fue más abundante en plasma de pacientes con ELA (con respecto a controles), sin embargo, resulta interesante encontrarla en plasma sanguíneo debido a que se trata de una proteína cerebral, lo cual se podría explicar por su paso a través de BHE, ya que la integridad esta se encuentra comprometida por diversos mecanismos como la neuroinflamación y la exacerbación de la actividad proteolítica. Esta proteína funge como co-represor transcripcional mediante el reclutamiento de diversas desacetilasas de histonas (HDAC), teniendo como blanco genes relacionados al control de la apoptosis. A pesar de que esta proteína no ha sido relacionada con la ELA, ha sido ampliamente estudiada en cáncer por su papel en la sobrevivencia de las células tumorales en hipoxia. Con base a sus características moleculares, esta proteína puede participar en ELA a través de la represión transcripcional de la proteína de detención de crecimiento inducible por daño a DNA (GADD45GIP1), así como el reclutamiento del proteasoma de núcleo a citoplasma para el mantenimiento de espinas dendríticas (Zhang *et al.*, 2017).

Al parecer, las proteínas desreguladas que identificamos juegan un papel en el desarrollo de la ELA, específicamente en los procesos moleculares que conlleva la patología, dichos procesos han sido previamente descritos (Kiernan *et al.*, 2011), de estos mecanismos las proteínas identificadas participan principalmente en: desregulación génica, resultando en cambios en la expresión de transcritos y, por ende, de proteínas; alteraciones en el metabolismo de biomoléculas, que provoca errores en el transporte celular y en algunos casos errores en diversas vías de señalización; agregación de proteínas, por errores en la abundancia de algunas chaperonas y en el

proteasoma, lo cual conlleva a proteínas mal plegadas que generan depósitos intracelulares tóxicos para las células; activación de la glía, que resulta en la liberación de moléculas neurotóxicas; neuroinflamación, proceso que deriva de la activación de la glía, así mismo es un determinante de la neurodegeneración ya que generalmente se acompaña de daño tisular/celular; errores en mecanismos de detoxificación celular, que favorecen un incremento de los radicales libres, especialmente las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como de peróxido de hidrógeno, producidos por el propio metabolismo; y finalmente, desregulación proteolítica, la cual conduce a alteraciones de diversos órganos, matriz extracelular y degeneración neuromuscular (Küger *et al.*, 2013).

Con respecto a la desregulación proteolítica, en este estudio se encontró un aumento estadísticamente significativo en la actividad de la MMP-9 en el plasma de los pacientes con ELA. Este aumento en la actividad puede ser atribuido a la desregulación proteómica mencionada con anterioridad, ya que varias proteínas identificadas como desreguladas participan en el control de la proteólisis. El aumento en la actividad proteolítica se ve reflejado principalmente en la clínica y se traduce en alteraciones a nivel sistémico, sin embargo, en la ELA la principal manifestación es la degeneración de nervio-músculo. Aunado a esto, el análisis de correlación entre la actividad proteolítica de la MMP-9 y los datos clínicos (ALSFRS-R e índice de Kimura), mostró una correlación estadística entre dichas variables, lo que sugiere que las MMP pueden fungir como indicadores de progresión de la enfermedad ya que mientras mayor sea la actividad proteolítica, la evolución y severidad de la enfermedad será mayor, mientras que la funcionalidad se reducirá.

10. Conclusiones

Los plasmas de pacientes con ELA presentan una expresión diferencial de 37 proteínas diferenciales con respecto al plasma de individuos sanos, de las cuales 14 de las que se identificaron se encuentran relacionadas a procesos como neuroinflamación, metabolismo de biomoléculas, detoxificación celular, regulación de MEC, control de actividad proteolítica, regulación génica y mantenimiento de sistema nervioso.

Entre las proteínas desreguladas en ELA se encontró a la serpin-1, la clusterina, la proteína asociada a núcleo accumbens y la ankirina-1; las cuales no han sido del todo caracterizadas o en algunos casos reportadas previamente en casos de ELA.

Existe una desregulación en la actividad proteolítica en el plasma de los pacientes, la cual es significativamente mayor con respecto al plasma de individuos sanos. A mayor actividad proteolítica, el cuadro clínico (como evolución, funcionalidad y severidad de la enfermedad) se verá de igual forma afectado.

11. Perspectivas

- Cuantificar mediante pruebas más específicas (ELISA y western blot) la abundancia y actividad de las MMP en plasmas de pacientes con ELA y controles.
- Realizar la confirmación de la abundancia diferencial de al menos dos de las proteínas identificadas por MS que no han sido caracterizadas en ELA.
- Realizar estudios moleculares que permitan caracterizar a la proteína asociada a núcleo accumbens con la ELA.
- Identificar y cuantificar a la proteasa diferencial observada en los pacientes con ELA mediante técnicas proteómicas más sensibles, como por ejemplo el marcaje con sondas isobáricas.
- Analizar por técnicas de *Shotgun Proteomics* los plasmas de pacientes para obtener un espectro más amplio de los cambios en el perfil proteómico del plasma de pacientes con ELA.
- Ampliar la n muestral y comparar los resultados obtenidos a partir de plasmas de pacientes con LCR.
- Realizar ensayos funcionales para determinar la participación de alguna de las proteínas identificadas en el desarrollo o evolución de la patología.

12. Bibliografía

- Aalling, J. N., Finmann, M. A. S., Lundgaard, I. and Nedergaard, M. (2015). The glymphatic system: A beginner's guide. *Neurochem Res.* 1, 1-17.
- Aggarwal, A. (2006). Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Indian J Pediatr.* 73(3): 225-226.
- Andersen, P. M., Abrahams, S., Borasio, G. D., Carvalho, M., Chio, A., Pierre-Francois, P. P., Silani, V., Tomik, B., Wasner, M. and Weber, M. (2012). EFNS guidelines on the clinical management of Amyotrophic Lateral Sclerosis (MALS)-revised report of an EFNS task force. *European J Neurol.* 19, 360-375.
- Bai, S., Liu, S., Guo, X., Qin, Z., Wang, B., Li, X., Qin, Y. and Liu, Y. (2009). Proteome analysis of biomarkers in the cerebrospinal fluid of neuromyelitis optica patients. *Mol Vis.* 15, 1638-1648.
- Barschke, P., Oeckl, P., Steinacker, P., Ludolph, A. and Otto, M. (2017). Proteomic studies in the discovery of cerebrospinal fluid biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Rev Proteomics.* 1, 1-24.
- Beeldman, E., Raaphorst, J., Klein, T. M., Visser, M., Schmand, B. A. and Haan, R. J. (2015). The cognitive profile of ALS: a systematic review and meta-analysis update. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 0, 1-9.
- Bowser, R. and Lacomis, D. (2009). Applying proteomics to the diagnosis and treatment of ALS and related diseases. *Muscle Nerve.* 40, 753-762.
- Bowser, R., Cudkowicz, M. and Kaddurah-Daouk, R. (2006). Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 6(3): 387-398.
- Bowser, R., Turner, M. R. and Shefner, J. (2011). Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: opportunities and limitations. *Nat Rev Neurol.* 7, 631-638.
- Caballero-Hernandez, D., Toscano, M. G., Cejudo-Guillen, M., Garcia-Martin, M. L., Lopez, S., Franco, J. M., Quintana, F. J., Roodveldt, C. and Pozo, D. (2016). The "Omics" of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Trends Mol Med.* 22(1): 53-67.
- Cervo, A., Coccozza, S., Sacca, F., Giorgio, S., Brescia, V., Tedeschi, E., Vacca, G., Palma, V., Brunetti, A. and Quarantelli, M. (2015). The combined use of conventional MRI and MR spectroscopic imaging increases the diagnostic accuracy in amyotrophic lateral sclerosis. *European J Radiol.* 1, 1-39.

- Chandrasekhar, K., Dileep, A., Lebonah, D. E. and Kumari, J. P. (2014). A short review on proteomics and its applications. *Int J Nat Sci.* 17, 77-84.
- Chen, S., Sayana, P., Zhang, X. and Le, W. (2013). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol Neurodeg.* 8(28):1-15.
- Chen, W. W., Zhang, X. and Huang, W. J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molec Med Rep.* 13, 3391-3396.
- Chen, Y., Lin, S., Yeh, Y., Hsiao, H., Wu, C., Chen, S. and Wang, A. (2005). A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. *Electrophoresis.* 26, 2117-2127.
- Chen, Y., Liu, X., Wu, J. J., Ren, H. M., Wang, J., Ding, Z. and Jiang, Y. (2015). Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Therap Med.* 11, 2095-2106.
- Chiara, G., Marcocci, M. E., Sgarbanti, R., Civitelli, L., Ripoli, C., Piacentini, R., Garaci, E., Grassi, C. and Palamara, A. T. (2012). Infectious agents and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 1, 1-25.
- Chiò, A., Logroscino, G., Traynor, B. J., Collins, J., Simeone, J. C., Goldstein, L. A. and White, L. A. (2013). Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiol.* 41(2): 118-130.
- Collins, M. A., An, J., Hood, B. L., Conrads, T. P. and Bowser, R. P. (2015). Label-free LC-MS/MS proteomic analysis of cerebrospinal fluid identifies protein/pathway alterations and candidate biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Proteome Res.* 14, 4486-4501.
- Conraux, L. Pech, C., Guerraoui, H., Loyaux, D., Ferrara, P., Guillemot, J. C., Meininger, V., Pradat, P. F., Salachas, F., Bruneteau, G., Forestier, N. and Lacomblez, L. (2013). Plasma peptide biomarker discovery for amyotrophic lateral sclerosis by MALDI-TOF mass spectrometry profiling. *PLOS ONE.* 8, 1-13.
- Costa, J. and Carvalho, M. (2016). Emerging molecular biomarker targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chim Acta.* 455, 7-14.
- Coupé, C. and Gordon, P. (2013). Amyotrophic Lateral Sclerosis – Clinical features, pathophysiology and management. *European Neurol Rev.* 1, 38-44.
- Cunha, S. & Mohler, P. J. 2009. Ankyrin protein in membrane formation and stabilization, *J. Cell. Mol. Med.* 13(11):4364-4376.

- D'Arriago, A., Colavito, D., Peña-Altamira, E., Fabris, M., Dam, M., Contestabile, A. and Leon, A. (2010). Transcriptional profiling in the lumbar spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a role for wild-type superoxide dismutase 1 in sporadic disease?. *J Mol Neurosci.* 41, 404-415.
- Dion, P. A., Daoud, H. and Rouleau, G. A. (2009). Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nature.* 10, 769-782.
- Elf, K. Schevchenko, G., Nyrgren, I., Larsson, L., Bergquist, J., Askmark, H. and Artemenko, K. (2014). Alterations in muscle proteome of patients diagnosed with amyotrophic lateral sclerosis. *J Proteomics.* 1, 1-31.
- Ellis, J. M., Wong, G. W. and Wolfgang, M. J. (2013). Acyl Coenzyme A Thioesterase 7 regulates neuronal fatty acid metabolism to prevent neurotoxicity. *Mol Cell Biol.* 33, 1869-1882.
- Engelen-Lee, J., Blokhuis, A. M., Spliet, W., Pasterkamp, R. J., Aronica, E., Demmers, J. A. A., Broekhuizen, R., Nardo, G., Bovenschen, N. and Van Der Berg, L. H. (2016). Proteomic profiling of the spinal cord in ALS: decreased ATP5D levels suggest synaptic dysfunction in ALS pathogenesis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degen.* 1, 1-11.
- Fahy, B., Lareau, S. and Meek, P. (2006). What is alpha-1 antitrypsin deficiency?. *Am J Respir Crit Care Med.* 173, 5-6.
- Franchignoni, F., Mora, G., Giordano, A., Volanti, P. and Chiò, A. (2013). Evidence of multidimensionality in the ALSFRS-R Scale: a critical appraisal on its measurement properties using Rasch analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 84, 1340-1345.
- Frankowski, H., Gu, Y. H., Heo, J., Milner, R. and Zoppo, G. (2012). Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. *Methods Mol Biol.* 814, 221-233.
- Fröhlander, N. and Forsgren, L. (1988). Haptoglobin groups in motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 51, 440-442.
- Garbuzova-Davis, S., Rodrigues, M. C. O., Hernandez-Ontiveros, D. G., Louis, M. K., Willing, A. E., Borlongan, C. V. and Sanberg, P. R. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis: A neurovascular disease. *Brain Res.* 1,113-125.
- Giudice, R., Monti, D., Sarcinelli, C., Piccoli, R. and Hu, G. F. (2014). Amyloidogenic variant of apolipoprotein A-I elicits cellular stress by attenuating the protective activity of angiogenin. *Cell Death Dis.* 5, 1-9.

- Gordon, P. H. (2013). Amyotrophic lateral sclerosis: An update for 2013 clinical features, pathophysiology, management and therapeutic trials. *Aging Dis.* 4, 295-310.
- Harms, M. B. and Baloh, R. H. 2013. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin.* 31, 929-950.
- Ikemoto, A., Hirano, A. and Akiguchi, I. (2000). Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis with extra-motor system degeneration: Characteristics and differences in the molecular pathology between ALS with dementia and Guamanian ALS. *Amyotroph Lat Scler Other Motor Neuron Disord*, 1, 97-104.
- Jimenez-Moreno, Newman, J., Charman, S. J., Catt, M., Trenell, M. I., Gorman, G. S., Hogrel, J. Y. and Lochmüller, H. (2017). Measuring habitual physical activity in neuromuscular disorders: A systematic review. *J Neuromusc Dis.* 4, 25-52.
- Kaur, S., McKeown, S. R. and Rashid, S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene.* 557, 109-118.
- Kellner, R. (2000). Proteomics. Concepts and perspectives. *J Anal Chem.* 366, 517-524.
- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J. R. and Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet.* 377, 942-955.
- Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L., Boulting, G., Moccia, R., Wainger, B. J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., Mellin, C., Merkle, F., Davis-Dusenbery, B., Ziller, M., Oakley, D., Ichida, J., Constanzo, S., Atwater, N., Maeder, M., Goodwin, M., Nemesh, J., Handsaker, R., Paull, D., McCarroll, S., Joung, J. K., Woolf, C., Brown, R. and Egan, K. (2014). Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant *SOD1*. *Cell Stem Cell.* 14, 781-795.
- Knibb, J. A., Keren, N., Kulka, A., Leigh, N. P., Martin, S., Shaw, C., Tsuda, M. and Al-Chalabi, A. (2016). A clinical tool for predicting survival in ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 0,1-7.
- Kolarcik, C. and Bowser, R. (2012). Retinoid signaling alterations in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Neurodegener Dis.* 1, 130-145.
- Kovacs, G. G. (2014). Current concepts of neurodegenerative diseases. *EMJ Neurol.* 1, 78-86.

- Krüger, T., Lautenschlager, J., Grosskreutz, J. and Rhode, H. (2013). Proteome analysis of body fluids for amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery. *Proteomics clin Appl.* 7, 128-136.
- Li, H. F. and Wu, Z. Y. (2016). Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis. *Transl Neurodegen.* 5, 1-10.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. Eccles, J. D., Rouhani, S., Peske, J. D., Derecki, N. C., Castle, D., Mandell, J. W., Lee, K. S., Harris, T. H. and Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature.* 0, 1-17.
- Lussier, B. and Wilson, A. A. (2016). Alpha-1 antitrypsin: the protein. *Resp Med.* 1, 17-32.
- Mariosa, D., Hammar, N., Malmstrom, H., Ingre, C., Jungner, I., Ye, W., Fang, F. and Walldius, G. (2017). Blood biomarkers of carbohydrate, lipid and apolipoprotein metabolisms and risk of amyotrophic lateral sclerosis: more than 20 years follow-up of the Swedish AMORIS cohort. *Ann Neurol.* 1, 1-33.
- Martinez, H. R., Parada-Garza, J. D., Meza, M. E., Gonzalez-Garza, M. T. and Moreno-Cuevas, J. E. Esclerosis lateral amiotrófica. Contribución de la neurología mexicana de 1998 a 2014. *Rev Mex Neuroci.* 15, 355-362.
- Miller, R. G., Mitchell, J. D. and Moore, D. H. (2012). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 3, 1-30.
- Oeckl, P., Jardel, C., Salachas, F., Lamari, F., Andersen, P., Bowser, R., Carvalho, M., Costa, J., Damme, P., Gray, E., Grosskreutz, J., Hernandez-Barral, M., Herukka, S., Huss, A., Jeromin, A., Kirby, J., Kuzma-Kozakiewicz, M., Amador, M., Mora, J., Morelli, C., Muchkova, P., Petri, S., Poesen, K., Rhode, H., Rikardsson, A., Robberecht, W., Rodriguez, A., Shaw, P., Silani, V., Steinacker, P., Turner, M., Tüzün, E., Yetimler, B., Ludolph, A. and Otto, M. (2016). Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarkers for ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degen.* 1, 1-10.
- Pando-Robles, R. V. and Lanz-Mendoza, H. (2009). La importancia de la proteómica en la salud pública. *Salud Pública de México.* 51, 386-395.
- Piao, Y., Wakabayashi, K., Kakita, A., Yamada, M., Hayashi, S., Morita, T., Ikuta, F., Oyanagi, K. and Takahashi, H. (2003). Neuropathology with clinical correlations of

sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000. *Brain Pathol.* 12, 10-22.

- Raaphorst, J., Visser, M., Linssen, W., Haan, R. and Schmand, B. (2010). The cognitive profile of amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis. *Amiotroph Lat Scler.* 11, 27-37.
- Ranganathan, S., Williams, E., Ganchev, P., Gopalakrishnan, V., Lacomis, D., Urbinelli, L., Newhall, K., Cudkowicz, M. E., Brown, R. and Bowser, R. (2005). Proteomic profiling of cerebrospinal fluids identifies biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 95, 1461-1471.
- Renton, A., Chiò, A. and Traynor, B. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature Neurosc.* 17, 17-23.
- Riancho, J., Berciano, M. T., Ruiz-Soto, M., Berciano, J., Landreth, G. Lafarga, M. (2015). Retinoids and motor neuron disease: Potential role in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1,1-24.
- Riva, N., Clarelli, F., Domi, Teuta., Cerri, F., Gallia, F., Trimarco, A., Brambilla, P., Lunetta, C., Lazzerini, A., Lauria, G., Taveggia, C., Iannaccone, S., Nobile-Orazio, E., Comi, G., D'Antonio, M., Martinelli-Bonescchi, F. and Quattrini, A. (2016). Unraveling gene expression profiles in peripheral motor nerve from amyotrophic lateral sclerosis patients: insights into pathogenesis. *Nature.* 6, 1-15.
- Roggenbuck, J., Quick, A. and Kolb, S. (2016). Genetic testing and genetic counseling for amyotrophic lateral sclerosis: an update for clinicians. *Genet Med.* 1, 1-8.
- Ryberg, H. and Bowser, R. (2008). Protein biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Rev Proteom.* 5, 249-262.
- Ryberg, H., An, J., Darko, S., Lustgarten, J. L., Jaffa, M., Gopalakrishnan, V., Lacomis, D., Cudkowicz, M. E. and Bowser, R. (2010). Discovery and verification of amyotrophic lateral sclerosis biomarkers by proteomics. *Muscle Nerve.* 42, 104-111.
- Saberi, S., Stauffer, J. E., Schulte, D. J. and Ravits, J. (2015). Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis and its variants. *Neurol Clin.* 33, 855-876.
- Sathasivam, S. (2010). Motor neurone disease: clinical features, diagnosis, diagnostic pitfalls and prognostic markers. *Singapore Med J.* 51, 367-374.
- Saxena, S. and Caroni, P. (2016). Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron.* 71, 35-49.

- Sekine, J., Nakatani, E., Ohira, K., Hideshima, K., Kanno, T., Nariai, Y., Kagimura, T. and Urano, T. (2015). Nucleus accumbens-associated protein 1 expression has potential as a marker for distinguishing oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *PLOS ONE*. 10, 1-10.
- Shawky, R. M. (2013). Reduced penetrance in human inheritance disease. *Egypt J Med Hum Genet*. 15,-103-111.
- Sheta, E., Appel, S. H. and Goldknopf, I. L. (2006). 2D gel blood serum biomarkers reveal differential clinical proteomics of the neurodegenerative diseases. *Expert Rev Proteomics*. 3, 45-62.
- Siddique, N. and Siddique, T. (2008). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 19, 429-459.
- Silverman, E. and Sandhaus, R. A. (2009). Alpha1- antitrypsin deficiency. *N Engl J Med*. 360, 2749-2757.
- Simonian, M. (2016). Proteomics in Medicine. *J Data Mining Genom Proteom*. 7, 1pp.
- Skovronsky, D., Lee, V. M. and Trojanowski, J. Q. (2006). Neurodegenerative diseases: New concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 1, 151-170.
- Tefera, T. W. and Borges, K. (2017). Metabolic dysfunctions in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis and potential metabolic treatments. *Front Neurosci*. 10, 1-15.
- Tiryaki, E. and Horak, H. A. (2014). ALS and other motor neuron diseases. *American Acad Neurol*. 1, 1185-1208.
- Tremlett, H., Dai, D. L., Hollander, Z., Kapanen, A., Aziz, T., Wilson-McManus, J. E., Tebbutt, S., Borchers, C., Oeger, J. and Cohen, G. (2014). Serum proteomics in multiple sclerosis disease progression. *J Proteomics*. 1, 1-41.
- Turner, M., Bowser, R., Bruijn, L., Dupuis, L., Ludolph, A., Mcgrath, M., Manfredi, G., Maragakis, N., Miller, R., Pullman, S., Rutkove, S., Shaw, P., Shefner, J. and Fischbeck, K. H. (2013). Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 14, 19-32.
- Wang, X. S., Simmons, Z., Liu, W., Boyer, P. J. and Connor, J. R. (2006). Differential expression of genes in amyotrophic lateral sclerosis revealed by profiling the post mortem cortex. *Amyotroph Lateral Scler*. 7, 201-216.
- Wormser, U., Mandrioll, J., Vinceti, M., Fini, N., Sintov, A., Brodsky, B., Proskura, E. and Finkelstein, Y. (2016). Reduced levels of alpha-1-antitrypsin in cerebrospinal fluid of

amyotrophic lateral sclerosis patients: a novel approach for a potential treatment. *J Neuroinfl.* 13, 1-15.

- Xu, Z., Lee, A., Hendersen, R. and McCombe, P. (2017). Gelsolin, clusterin and CD5L are the potential plasma biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis with and without cognitive impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 88, 1-13.

- Yates, D. (2012). Neurodegenerative networking. *Nature Rev Neurosc.* 13, 1pp.

- Yu, L., Guan, Y., Wu, X., Chen, Y., Liu, Z., Du, H. and Wang, X. (2013). Wnt signaling is altered by spinal cord neuronal dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *Neurochem Res.* 1, 1-10.

- Zhang, Y., Ren, Y., Guo, L., Ji, C., Hu, J., Zhang, H., Xu, Q., Zhu, W., Ming, Z., Yuan, Y., Ren, X., Song, J. and Yang, Y. (2017). Nucleus accumbens-associated protein-1 promotes glycolysis and survival of hypoxic tumor cells via the HDAC4-HIF-1 α axis. *Oncogene.* 36, 4171-4181.

- Zinkie, S., Gentil, B. J., Minotti, S. and Durham, H. D. (2013). Expression of the protein chaperone, clusterin, in spinal cord cells constitutively and following cellular stress, and upregulation by treatment with Hsp90 inhibitor. *Cell Stress Chap.* 18: 745-758.

- Zundert, B., Izaurieta, P., Fritz, E. and Alvarez, F. J. (2012). Early pathogenesis in the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Cell Biochem.* 113, 1-19.

Apéndice 1

Carta de consentimiento informado aprobada por el comité de bioética del INNN.

	INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ LIC. SANITARIA 04 AM 0913012	Formato N°																
Consentimiento para participar en la Investigación de la estructura genética de la población mexicana																		
NOMBRE DEL SUJETO _____		FECHA NACL. _____																
FECHA EN LA QUE SE REALIZARÁ EL PROCEDIMIENTO _____																		
Yo _____, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de persona aparentemente sana: DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE: 1. He sido informado (a) que en el Departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este Instituto se están realizando estudio para determinar las variaciones en genes (que son las unidades de la herencia) en personas, aparentemente sanas, de la población mexicana. 2. Los genes que se van a estudiar son los siguientes: <i>Apolipoproteína E, ataxinas, CYP2D6, N-acetiltransferasa, presenilina 1, progranulina, SOD1, C9orf72, frataxina</i>. Estos genes pueden presentar variantes (polimorfismos) cuya frecuencia varía en diferentes poblaciones. 3. He sido informado (a) que para analizar estos genes es necesario que done una muestra de 10 a 20 ml. de sangre periférica para que de ahí se extraiga el DNA que es el material hereditario y se estudien los genes antes mencionados. 4. He sido informado (a) que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción. 5. He sido informado (a) que se me hará un árbol genealógico y se me preguntará acerca de las enfermedades que he padecido, así como las de mi familia. 6. Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible solo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de letras y números para proteger mi identidad. 7. He sido informado (a) que mi participación en este estudio es <u>VOLUNTARIA</u> y no tiene costo alguno para mí, ni recibiré remuneración alguna. 8. Los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra no me serán entregados, a menos que se encuentre información relevante para mi salud o la de mis familiares. En dicho caso seré contactado (a) por los investigadores para saber si deseo conocer la información y si deseo participar en otros estudios que contribuyan a un diagnóstico y manejo adecuados. 9. Para cualquier duda o aclaración puede dirigirse al departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este Instituto con la Dra. Petra Yescas o con el Dr. Tirso Zúñiga o comunicarse al Tel. 56 06 38 22 Ext. 2002 y/o 3041. ANTECEDENTES <table style="width: 100%;"><tr><td>Tabaquismo</td><td>Sí</td><td>No</td><td>Años _____ Cantidad promedio: _____</td></tr><tr><td>Alcohol</td><td>Sí</td><td>No</td><td>Años _____ Tipo de bebida _____</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td>Cantidad _____</td></tr><tr><td>Drogas</td><td>Sí</td><td>No</td><td>Tipo y frecuencia _____</td></tr></table>			Tabaquismo	Sí	No	Años _____ Cantidad promedio: _____	Alcohol	Sí	No	Años _____ Tipo de bebida _____				Cantidad _____	Drogas	Sí	No	Tipo y frecuencia _____
Tabaquismo	Sí	No	Años _____ Cantidad promedio: _____															
Alcohol	Sí	No	Años _____ Tipo de bebida _____															
			Cantidad _____															
Drogas	Sí	No	Tipo y frecuencia _____															
Insurgentes Sur # 3877, Col. La Fama 14269, México, D.F. Tel. (55) 56063822 www.innn.salud.cob.mx																		



Sedentarismo Si No
Hipertensión Si No Años de evolución _____
Diabetes Mellitus Si No Años de evolución _____
Colesterol alto Si No Años de evolución _____
Cardiopatía Si No Años de evolución _____
Insuficiencia art. Si No Años de evolución _____
Otras (especificar) _____

LUGAR DE ORIGEN (NACIMIENTO)

Abuelo paterno: _____

Abuela paterna: _____

Abuelo materno: _____

Abuela materna: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

ENFERMEDAD	SI	NO	FAMILIAR AFECTADO
EMBOLIA CEREBRAL			
COLESTEROL			
DIABETES			
PARKINSON			
PERDIDA DE MEMORIA			
EPILEPSIA			
CANCER			
Tipo de cáncer: _____			

FIRMA DEL SUJETO DE INVESTIGACION Y RESPONSABLE LEGALAL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA

Género: H M Teléfono: _____

Dirección: _____

Origen: _____ Edad: _____ Ocupación: _____

Edo. Civil: _____ Escolaridad: _____ Email: _____

Fecha de nacimiento: _____

NOMBRE, FIRMA Y CEDULA DEL MEDICO_____
NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANTE_____
NOMBRE Y FIRMA TESTIGO_____
NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

Apéndice 2

Soluciones y amortiguadores empleados.

Amortiguador de muestra nativo: Tris HCl pH 6.8 [250 mM], glicerol [40%] y azul de bromofenol [0.01%].

Amortiguador de corrida: Tris [25 mM]; glicina [192 mM]; SDS [0.04%].

Amortiguador de activación: Tris-HCl pH 7.4 [50 mM]; CaCl_2 [15 mM] y NaN_3 [0.02%].

Solución desteñidora: Ácido acético [5%]; MeOH [16.5%] y H_2O c.b.p. 1 L.

Solución TUC: urea [7 M]; tiourea [2 M] y CHAPS [4%].

Reactivo de Bradford: Azul de Coomasie G-250 [0.01%]; etanol [4.7%] y ácido fosfórico [85%].

Amortiguador de muestra: Tris-HCl pH 6.8 [250 mM], glicerol [40%], SDS [8%], azul de bromofenol [0.01%].

Amortiguador de equilibrio: Tris-HCl [50 mM] pH 8.8, urea [6 M], glicerol [30%], SDS [2%].

Solución fijadora: MeOH [50%], H_3PO_4 [2%] y H_2O c.b.p. 1 L.