



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

Estudio en fase I de utilización de las
células madre de médula ósea autólogas
en pacientes con esclerosis lateral
amiotrófica

D. Miguel Blanquer Blanquer

2012

Sigamos buscando, a pesar de todo. Sigamos buscando. De hecho, es el mejor método para encontrar, y tal vez, gracias a nuestros esfuerzos, el veredicto que daremos a nuestros pacientes de mañana no será el mismo que tenemos que dar hoy.

Jean-Martin Charcot. Clases de los martes en La Salpêtrière.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Largo ha sido el camino que me ha llevado hasta la culminación de este trabajo. Muchas personas han ido ofreciéndome su trabajo, su ilusión y su apoyo... y muchas más han tenido que soportar que no les hiciera el caso que se merecen. A todas ellas va mi agradecimiento. Todos saben quiénes son. Todos sabéis quiénes sois. No puedo dejar de nombrar, sin embargo, a aquellos que han sido condición de posibilidad para esta tesis. Nada hubiera podido hacer sin el esfuerzo continuado de mis padres -físico, económico y moral- para hacer de mí un buen hombre y un buen médico, desde que descubrieron mi vocación. Nada de esto hubiera sucedido tampoco si José María no se hubiera cruzado en mi vida. Gracias a él trabajo justo en aquello que, mientras hacía la carrera e iba conociendo la Medicina, me ilusionaba como mi posible línea de dedicación profesional y de investigación. Tampoco sin Salvador, que nos sacó a los dos de las aguas mansas del trasplante hematopoyético al agitado mar de la terapia celular. Y no puedo acabar sin nombrar a Paqui Iniesta. ¿Qué hubiera sido de todos nosotros sin ella? Verdaderamente, puedo dar gracias a Dios por haberme puesto las cosas tan fáciles, por haberme colocado a vuestro lado.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. <i>ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA</i>	3
1.1. <i>Introducción histórica</i>	3
1.2. <i>Definición y criterios diagnósticos</i>	4
1.3. <i>Epidemiología y genética</i>	5
1.4. <i>Rasgos clínicos</i>	8
1.5. <i>Patogenia</i>	10
1.5.1. <i>Estrés oxidativo</i>	10
1.5.2. <i>Disfunción mitocondrial</i>	12
1.5.3. <i>Excitotoxicidad</i>	13
1.5.4. <i>Agregación proteica</i>	15
1.5.5. <i>Alteración en la regulación del tráfico endosómico</i>	16
1.5.6. <i>Alteración del transporte axonal</i>	16
1.5.7. <i>Inflamación</i>	16
1.5.8. <i>Estrés del retículo endoplasmático</i>	17
1.5.9. <i>Alteración en la regulación del procesamiento y</i> <i>transcripción del RNA</i>	17
1.5.10. <i>Déficits de factores neurotróficos</i>	18
1.5.11. <i>Papel de las células no neuronales</i>	18
1.5.12. <i>Resumen</i>	20
1.6. <i>Tratamiento</i>	22
1.7. <i>Pronóstico</i>	25
2. <i>LA TERAPIA CELULAR COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA</i>	27
2.1. <i>Las células madre del adulto</i>	28
2.2. <i>Células madre neurales en modelos de degeneración espinal</i>	30
2.3. <i>Células madre de la médula ósea en enfermedades</i> <i>neurodegenerativas</i>	31
2.4. <i>Ensayos clínicos de terapia celular en pacientes con ELA</i>	36

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	41
III. PACIENTES Y MÉTODOS	45
1. <i>Diseño del Ensayo Clínico</i>	47
2. <i>Criterios de selección</i>	49
2.1. <i>Criterios de inclusión</i>	49
2.2. <i>Criterios de exclusión</i>	49
3. <i>Variables de valoración</i>	50
3.1. <i>Variables principales</i>	50
3.2. <i>Variables secundarias</i>	50
4. <i>Procedimiento de obtención y trasplante de las células mononucleadas</i>	51
4.1. <i>Obtención de médula ósea</i>	51
4.2. <i>Preparación de las células mononucleadas de médula ósea</i>	53
4.3. <i>Citometría</i>	56
4.4. <i>Administración de las células a los pacientes: técnica neuroquirúrgica</i>	60
5. <i>Evaluaciones</i>	61
6. <i>Análisis estadístico</i>	64
7. <i>Estudio histológico e inmunohistoquímico</i>	64
IV. RESULTADOS	67
a. <i>Características de los pacientes</i>	69
b. <i>Recogida de las células mononucleadas de médula ósea y trasplante</i>	70
c. <i>Eventos adversos no severos relacionados con el tratamiento</i>	71
d. <i>Eventos adversos severos</i>	71
e. <i>Evolución clínica</i>	73
f. <i>Evolución radiológica</i>	78
g. <i>Estudio necrópsico</i>	80

V. DISCUSIÓN	85
1. <i>Factibilidad y seguridad de la inyección intraespinal de células mononucleadas de médula ósea autóloga</i>	88
2. <i>Efecto neurotrófico de las células mononucleadas de médula ósea autóloga</i>	92
VI. CONCLUSIONES	95
VII. BIBLIOGRAFÍA	99

TABLAS

Tabla 1 <i>Resumen de los criterios diagnósticos de El Escorial</i>	6
Tabla 2 <i>Tratamientos sintomáticos en la ELA</i>	26
Tabla 3 <i>Esquema de evaluaciones del ensayo clínico</i>	62
Tabla 4 <i>Anticuerpos utilizados en las tinciones inmunohistoquímicas</i>	66
Tabla 5 <i>Características de los pacientes</i>	69
Tabla 6 <i>Número y tipo de células infundidas</i>	70
Tabla 7 <i>Eventos adversos no severos relacionados</i>	72
Tabla 8 <i>Contaje de motoneuronas con nidos de células CD90+ y depósitos de ubiquitinina en los segmentos T4-T5 y T8-T9.</i>	83

FIGURAS

Figura 1 <i>Mecanismos moleculares de daño de la motoneurona en la ELA.</i>	21
Figura 2 <i>Objetivos terapéuticos y fármacos ensayados.</i>	23
Figura 3 <i>Disposición de las células de médula ósea alrededor de las motoneuronas.</i>	35
Figura 4 <i>Neurotrofismo mediado por GDNF.</i>	35
Figura 5 <i>Evolución radiológica en el ensayo de Mazzini et al.</i>	37
Figura 6 <i>Evolución de la capacidad vital forzada en el ensayo de Mazzini et al.</i>	38
Figura 7 <i>Extracción de la médula ósea y separación de las células mononucleadas mediante gradiente de densidad.</i>	58
Figura 8 <i>Laminectomía T3-T4 y exposición de la médula espinal.</i>	58
Figura 9 <i>Infusión de las células mononucleadas y cierre de las meninges.</i>	59
Figura 10 <i>Evolución de las escalas neurológicas</i>	75
Figura 11 <i>Evolución de las escalas respiratorias</i>	76
Figura 12 <i>Evolución de la escala POMS</i>	78
Figura 13 <i>Evolución de la calidad de vida</i>	78
Figura 14 <i>Resonancia nuclear magnética</i>	79
Figura 15 <i>Hallazgos anatomo-patológicos en la médula espinal</i>	81
Figura 16 <i>Media de motoneuronas por segmento espinal</i>	83

ABREVIATURAS

CHAT	Colinacetiltransferasa
CVF	capacidad vital forzada
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
PEM	Presión espiratoria máxima
PIM	Presión inspiratoria máxima

INTRODUCCIÓN

3. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

3.1. Introducción histórica

La primera descripción de la Esclerosis lateral amiotrófica, así como su definición como una entidad clínica independiente, fue realizada por Jean-Martin Charcot en 1874¹. En el momento en el que el Dr. Charcot inició sus observaciones no se había realizado todavía la distinción entre las motoneuronas superiores e inferiores, no se conocía el papel del tracto córticoespinal ni el valor diagnóstico de la hiperreflexia osteo-tendinosa o de los signos de Hoffmann y de Babinski, y, por tanto, no había modo de separar las distintas enfermedades cuyo signo fundamental es la debilidad muscular². El Dr. Jean-Martin Charcot se formó como médico y posteriormente trabajó desde 1862 hasta su muerte en 1893 en el Hôpital de la Salpêtrière³. Este hospital estaba dedicado desde su fundación en 1656 por Luis XIV a la atención de mujeres indigentes⁴. En la última mitad del siglo XIX residían en el Hôpital de la Salpêtrière miles de pacientes crónicos, muchos de ellos hasta su muerte. Este hecho posibilitó a la agudeza del Dr. Charcot aislar una serie de pacientes en los que únicamente se apreciaba debilidad muscular, sin ningún otro tipo de alteración neurológica o problema médico. El Dr. Charcot mantuvo un cuidadoso registro de la evolución clínica de estos pacientes prototípicos y realizó un atento análisis de sus necropsias, llevando a su culmen el método anatomo-clínico que adquirió de Laennec. De este modo, pudo comparar los hallazgos anatómicos en la médula espinal de sus pacientes con atrofia muscular medular infantil y poliomielitis con los descritos por Cruveilhier en 1853⁵ en pacientes que presentaban también una debilidad muscular progresiva, observando que en ambos casos se producía una atrofia de las raíces anteriores y una alteración de las células del asta anterior de la médula espinal. Sugería, por tanto, una relación causal de las neuronas motoras con el cuadro de amiotrofia. Por otro lado, en 1865 describió el caso de una mujer inicialmente diagnosticada como “histérica” que presentaba signos de espasticidad que se asociaban con una alteración de los tractos laterales de su médula espinal⁶, en lo que constituye la primera descripción de una esclerosis lateral primaria. En 1869,

describió junto con Joffroy dos pacientes en los que se combinaban la espasticidad y la amiotrofia⁷. Cinco años más tarde, revisó toda la experiencia adquirida y utilizó por primera vez el término Esclerosis lateral amiotrófica¹, realizando una descripción de la misma que no desmerece en absoluto de la que podríamos encontrar en cualquier tratado de neurología actual. Por desgracia, también continúa siendo exacta su descripción de la rápida evolución clínica de estos pacientes.

3.2. Definición y criterios diagnósticos

La Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) puede ser definida como una patología neurodegenerativa caracterizada por una parálisis muscular progresiva que refleja la degeneración de motoneuronas en la corteza motora, bulbo y médula espinal. La denervación de las fibras musculares secundaria a la pérdida de las correspondientes neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal produce debilidad, atrofia y fasciculaciones en los músculos afectados. El término esclerosis lateral se refiere al endurecimiento de los tractos corticoespinal anterior y lateral a medida que se degeneran las motoneuronas que los forman y son reemplazadas por gliosis⁸. La pérdida de estas motoneuronas produce espasticidad, reflejos tendinosos hiperactivos, signos de Hoffmann y Babinsky, clonus, y otros rasgos característicos de la enfermedad.⁸⁻¹⁰

El diagnóstico de la ELA se basa en la presencia de unas características clínicas bien definidas junto con la realización de una serie de pruebas para excluir la presencia de síndromes que simulan la ELA. Estos síndromes llegan a conducir a un diagnóstico erróneo en un 5-10% de los casos^{11, 12}. El hallazgo de signos clínicos sugestivos de afectación de primera y segunda motoneurona que no pueden ser explicados por ninguna otra enfermedad -tras la realización de estudios electrofisiológicos, de imagen y serológicos, y tras analizar el líquido cefalorraquídeo- junto con una progresión compatible con una enfermedad neurodegenerativa, sugiere el diagnóstico de ELA. Por tanto el diagnóstico de la ELA no depende de los

resultados de un único test, sino de la interpretación de las distintas exploraciones en conjunto con la historia del paciente y los hallazgos clínicos.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases desarrolló en El Escorial unos criterios diagnósticos en 1994¹³ que fueron revisados posteriormente en el año 2000¹⁴ y más recientemente en 2008¹⁵, y que resumimos en la tabla 1. Basados en esos criterios, los pacientes pueden ser clasificados en las categorías 'clínicamente definida', 'clínicamente probable', 'clínicamente probable con apoyo de laboratorio' y 'clínicamente posible'. Estos criterios son probablemente más útiles en el ámbito de la investigación clínica que en la práctica diaria de las consultas de Neurología¹⁶.

3.3. Epidemiología y genética

La incidencia comunicada en los estudios epidemiológicos sobre la ELA esporádica en la década de los 90 en Norteamérica y Europa osciló entre un 1.5 y un 2.7 por 100,000 habitantes/año con una media de 1.89 por 100,000 habitantes/año¹⁷. No hubo diferencias en la distribución de la incidencia entre los distintos países, que en España se sitúa en el 1/100.000 habitantes/año¹⁸. La prevalencia osciló entre un 2.7 y un 7.4 por 100,000 habitantes con una media de 5.2 por 100,000 habitantes¹⁷, siendo en España de 3,5 casos por cada 100.000 habitantes y año¹⁸. Sin embargo, la ELA afecta a personas de todo el mundo y su incidencia exacta todavía no es conocida¹⁹. El riesgo acumulado de padecer una ELA a los 70 años se ha estimado en un 1 por 1000 ^{20, 21}, aunque una estimación más precisa puede ser de 1 por 400 ²². La incidencia de la enfermedad en hombres (3,0 por 100.000 años-persona; 95% IC 2·8–3·3) es algo superior que en mujeres (2,4 por 100.000 años-persona; 95% CI 2·2–2·6), aunque estas diferencias no se aprecian en el caso de la ELA familiar. El pico de incidencia de la enfermedad se sitúa entre los 58 y los 63 años de edad para la ELA esporádica y los 47 y 52 años para la familiar²³. Sólo un 5% de los casos se presentan antes de los 30 años²⁴, aunque cada vez se reconocen más casos de debut juvenil de ELA esporádica²⁵. Hay evidencias que apuntan a que la ELA es menos común en personas de origen no europeo y de origen étnico mixto¹⁹, y que la mezcla genética

El diagnóstico de ELA requiere:

Presencia de	Ausencia de
Evidencia de degeneración del tipo de neurona motora inferior (MNI), por examen clínico, electrofisiológico o neuropatológico	Evidencia electrofisiológica o patológica de otra enfermedad o proceso que pueda explicar los signos de degeneración de neurona motora superior o inferior
Evidencia de degeneración de neurona motora superior (MNS) por examen clínico	Evidencia por neuroimagen de otro proceso o enfermedad, que pueda explicar los signos clínicos y electrofisiológicos observados
Diseminación progresiva de los síntomas o signos dentro de una región o de otras regiones, determinados por medio de la historia clínica o exploración física	

Categorías en la certeza del diagnóstico:

Nivel de certeza diagnóstica	Características clínicas
ELA clínicamente definida	Signos y/o síntomas de MNS y MNI en \geq tres regiones
ELA clínicamente probable	Signos y/o síntomas de MNS y MNI en \geq dos regiones y obligatoriamente algún signo de MNS rostral a signos de MNI
ELA clínicamente probable con apoyo de laboratorio	Signos y/o síntomas de MNS y MNI en una región, O signos y/o síntomas sólo de MNS en \geq una región; y cualquiera de ellas acompañada de signos de MNI en EMG en \geq dos regiones exclusión de otras causas a nivel de laboratorio y RM
ELA clínicamente posible	Signos y/o síntomas de MNS y MNI en una región o signos y/o síntomas de MNI en \geq dos regiones o signos y/o síntomas de MNI rostrales a los de MNS y exclusión mediante EMG de otros diagnósticos pero sin criterios de afectación de MNI en dos regiones exclusión de otras causas a nivel de laboratorio y RM

Regiones: Bulbar, cervical, torácica y lumbo-sacra.

MNS Neurona motora superior; MNI Neurona motora inferior

EMG Electromiografía; RM Resonancia magnética

Tabla 1 Resumen de los criterios diagnósticos de El Escorial, revisión del año 2000

puede ser protectora²⁶. Se ha detectado una agrupación de casos de ELA en ciertas profesiones como en los jugadores de fútbol italianos (pero no en otros deportistas)²⁷ y, posiblemente, militares desplegados en servicio^{28, 29}. Otros factores ambientales que se han asociado con la ELA son fumar^{30, 31} y la exposición a pesticidas, plomo, toxinas orgánicas y radiación electromagnética³².

El inicio bulbar es más común en mujeres y en los pacientes de mayor edad: un 43% de los pacientes con más de 70 años se presentan con síntomas bulbares, mientras que sólo un 15% de los pacientes con menos de 30 años lo hacen^{24, 33, 34}.

Aproximadamente un 5%-10% de los pacientes tienen historia familiar de ELA³⁵. El patrón hereditario es predominantemente mendeliano con una alta penetrancia, siendo autosómico dominante en la mayoría de los casos, aunque también se han comunicado familias con herencia autosómica recesiva^{36, 37}. La edad de inicio de la ELA familiar es aproximadamente una década anterior a la de la ELA esporádica y la supervivencia más corta^{36, 38, 39}. Hasta el momento se han identificado 13 genes y locus sin ningún denominador común biológico, pero que pueden ser divididos en 5 categorías principales: transporte axonal (*DCTN1* y *NEFH*), procesamiento de RNAm (*FUS*, *TARDBP*, *ANG*, *SETX*, *TAF15*, *ELP3* y *C9ORF72*), tráfico de vesículas endosómicas (*FIG4* y *VAPB*), ubiquitinación (*UBQLN2*⁴⁰ y *UNC13A*), y otras funciones (*SOD1*)⁴¹. Las mutaciones en *SOD1* constituyen un 20% de las ELA familiares⁴² y un 5% de las ELA aparentemente esporádicas. Las mutaciones en *TARDBP* son responsables de un 5 a un 10% de las ELA familiares, en *FUS* de un 5% y en *ANG* de un 1%⁴³.

El 90% restante de los pacientes son clasificados como ELA esporádica. En ellos, los estudios familiares han identificado un solapamiento entre la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas comunes. Esto sugiere la existencia de genes que pueden aumentar el riesgo global de neurodegeneración en los familiares. Sin embargo, los intentos de establecer la base genética de la ELA esporádica mediante la identificación de este tipo de genes han tenido poco éxito: los genes identificados confieren un riesgo que raramente excede una odds ratio de 2 y aumentan el riesgo mediante un mecanismo desconocido⁴⁴.

3.4. Rasgos clínicos

El fenotipo de la enfermedad se suele clasificar según el lugar en el que debuta⁴⁵. La ELA se inicia con debilidad en las extremidades en un 65% de los pacientes. Los síntomas iniciales son típicamente la caída del pie, la dificultad al andar, la pérdida de destreza en la mano o la debilidad del hombro. En aproximadamente un 30% de los pacientes la debilidad se inicia en la musculatura bulbar, normalmente con disartria (a menudo inicialmente solo se aprecia tras la ingesta de pequeñas cantidades de alcohol¹⁶) seguida de disfagia²³. Los síntomas debidos a la degeneración de la motoneurona inferior (debilidad, atrofia, calambres, fasciculaciones) a menudo eclipsan a los asociados con la motoneurona superior⁴⁶. Eventualmente la función de las extremidades se pierde, llevando al paciente a depender de los cuidadores: andar, permanecer de pie, desplazar peso se hace imposible. Las caídas son frecuentes.

Con el tiempo los pacientes dejan de poder hablar inteligiblemente. Los problemas para tragar pueden llevarles a babear, a la deshidratación, malnutrición con pérdida de peso y a tener broncoaspiraciones. La debilidad de la musculatura axial hace que no puedan mantener la cabeza erguida y que se produzca cifosis. La cifosis puede causar dolor, pérdida del equilibrio por cambio en el centro de gravedad y problemas con actividades como comer o conducir. Los esfínteres, la musculatura extraocular y la función sensitiva a menudo no se ven afectadas.

Un 20-50% de los pacientes a los que se les realiza tests neuropsicológicos tienen problemas cognitivos, y aproximadamente un 15% desarrollan demencia, siendo la frontotemporal la más frecuente⁴⁷. Las anomalías cognitivas llevan a cambios en la personalidad, el lenguaje, la capacidad de juicio y en los afectos. La abulia asociada y la reducción en la capacidad de juicio puede hacerles incapaces de participar en las decisiones sobre su tratamiento médico y acortar su supervivencia⁴⁸. También presentan labilidad emocional que se manifiesta con una pérdida de la inhibición normal de la risa y del llanto⁴⁹. La depresión y la ansiedad pueden ser características prominentes de la enfermedad en todas sus fases^{50, 51}. La ansiedad

puede acompañarse de síntomas de insuficiencia respiratoria y la depresión puede llevar a una disminución del apetito, sueño pobre y desesperanza.

Habitualmente se describe a la ELA como causante de debilidad muscular sin dolor. Sin embargo los pacientes pueden experimentar dolor a consecuencia de la reducción en su movilidad, la incapacidad de darse la vuelta en la cama, contracción de las articulaciones y úlceras por decúbito. Ocasionalmente, el dolor puede ser secundario a la misma enfermedad, posiblemente relacionado con la degeneración de los núcleos o cordones sensitivos. Los calambres pueden ser también dolorosos y pueden interferir con el sueño y la actividad física.

La dificultad para respirar y otros síntomas respiratorios normalmente ocurren tarde en la evolución de los pacientes. Los síntomas incluyen la ortopnea, cefaleas matinales y tos débil. Los pacientes desarrollan disnea de esfuerzo y, eventualmente, de reposo. El fallo respiratorio y las complicaciones pulmonares secundarias a la afectación bulbar, como la neumonía por broncoaspiración, son las causas de muerte más frecuentes⁵².

En la exploración física la primera manifestación de la enfermedad de inicio en extremidades o medular suele ser atrofia muscular focal especialmente en los músculos de las manos, antebrazos u hombros en las extremidades superiores, y de la zona proximal del muslo o de la musculatura distal del pie en las extremidades inferiores. Las fasciculaciones son habitualmente visibles en más de un grupo muscular. La espasticidad se evidencia por el aumento del tono muscular y el 'atrapamiento' supinador en los miembros superiores, y el 'atrapamiento' rotuliano, clonus e hipertonía en los miembros inferiores. Los reflejos tendinosos están aumentados de modo simétrico, incluso afectando a grupos musculares distintos al estimulado. El signo de Hoffmann puede ser positivo en los miembros superiores y el reflejo plantar es extensor con frecuencia.

En los pacientes con disfunción bulbar la disartria puede ser consecuencia tanto de la afectación de la motoneurona inferior como de la parálisis pseudobulbar secundaria a la afectación de la motoneurona superior. Ambas hacen que el paciente hable arrastrando las palabras y/o con una tonalidad nasal. Al explorar los nervios

craneales, el reflejo mandibular puede estar aumentado, especialmente en las formas de inicio bulbar. La debilidad facial típica de la afectación de la motoneurona superior afecta la mitad inferior de la cara, causando dificultad para sellar los labios y silbar. A menudo coexisten grados variables de debilidad facial de motoneurona superior e inferior. El reflejo nauseoso está preservado y, a menudo, aumentado. El paladar blando puede estar flácido. Los pacientes desarrollan fasciculaciones y atrofia de la lengua, cuyos movimientos están enlentecidos por espasticidad. El resto de los nervios craneales permanecen intactos aunque, en estadios tardíos de la enfermedad y muy infrecuentemente, los pacientes pueden desarrollar una parálisis supranuclear oculomotora^{53, 54}. La exploración sensitiva es casi siempre anodina. A medida que la enfermedad progresa, los pacientes desarrollan el cuadro característico de combinación de afectación de motoneurona superior e inferior en la misma región del sistema nervioso central, afectando los territorios bulbar, cervical, torácico y lumbar⁵⁵. Esta progresividad en la afectación de las motoneuronas superiores e inferiores hace que el diagnóstico sea incierto en los inicios de la enfermedad. De hecho, la mayoría de los pacientes han sido vistos al menos por dos o tres especialistas antes de ser formalmente diagnosticados. El tiempo medio desde la aparición del primer síntoma hasta el diagnóstico definitivo es de 9-15 meses, sea cual sea el sistema de salud en el que se encuentre el paciente⁵⁶.

3.5. PATOGENIA

A pesar de la intensa investigación realizada sobre la ELA, el mecanismo exacto por el que se produce continua siendo desconocido. Probablemente, la ELA es el resultado de una compleja interacción entre varios mecanismos que pueden no ser mutuamente exclusivos¹⁶. Estos mecanismos incluyen:

3.5.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo causa daño estructural y cambios en las rutas de señalización sensibles al equilibrio redox. Surge de un desequilibrio entre la generación y destrucción de especies reactivas de oxígeno, y/o de la reducción de la

capacidad del sistema biológico de eliminar o reparar el daño creado por éstas. La acumulación de estrés oxidativo en neuronas que no se dividen durante el envejecimiento puede ser un factor importante que convierte la capacidad de hacer frente a una agresión tóxica, como la presencia de una mutación causante de enfermedad, en un círculo vicioso de lesión celular que culmina en la muerte neuronal y el inicio de la neurodegeneración en la mitad de la vida o más tarde. Se ha puesto un interés particular en el papel del estrés oxidativo porque las mutaciones en SOD1, que codifica una proteína antioxidante, son responsables de un 20% de los casos de ELA familiar⁴².

Se ha observado una elevación en los marcadores de daño por radicales libres en muestras de suero, orina y líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA⁵⁷⁻⁵⁹. Además, se han encontrado niveles elevados de daño oxidativo a proteínas⁶⁰, lípidos⁶¹ y DNA⁶² en tejido postmortem de casos de ELA esporádica y de ELA familiar relacionada con la mutación SOD1. También se ha documentado daño oxidativo a RNA en modelos murinos de SOD1 y en el sistema nervioso central de humanos⁶³. En el modelo murino, la oxidación del RNAm se encuentra primariamente en motoneuronas y oligodendrocitos, sucede en los estadios tempranos presintomáticos de la enfermedad, y se asocia con una disminución de las proteínas codificadas. Algunos RNAm parecen ser más susceptibles a la oxidación, incluyendo los relacionados con la cadena de transporte de electrones mitocondrial, rutas de biosíntesis, conformación y degradación de proteínas, mielinización, citoesqueleto y la ruta del ciclo del ácido tricarboxílico y glucólisis⁶³. El daño oxidativo se ha podido observar en modelos murinos y celulares de ELA relacionada con SOD1⁶⁴. Los modelos celulares recientes de ELA relacionada con la mutación de TDP-43 indican que la presencia de esta proteína también induce estrés oxidativo en líneas celulares de motoneurona⁶⁵.

El origen del estrés oxidativo en la ELA ha sido estudiado en profundidad en los modelos murinos de mutación SOD1, en los que se han propuesto varias reacciones oxidativas aberrantes⁶⁴. Sin embargo, SOD1 mutadas y enzimáticamente inactivas son todavía capaces de causar degeneración de motoneuronas⁶⁶, y hay evidencias

recientes de que la SOD1 mutada puede causar estrés oxidativo por mecanismos distintos a su capacidad catalítica. Concretamente, la SOD1 mutada aumenta la producción de superóxido mediada por la NADPH oxidasa (NOX) bloqueando Rac1 en su estado inactivo en el complejo NOX, resultando en una prolongación de la producción de especies reactivas de oxígeno⁶⁷. La expresión de NOX2 está aumentada en los ratones con SOD1 mutante y en el SNC de pacientes con ELA, y el knockout de NOX1 y de NOX2 provocan un aumento de la supervivencia de los ratones⁶⁸.

Múltiples estudios han mostrado que el estrés oxidativo interacciona con, y potencialmente exagera, otros procesos fisiopatológicos que contribuyen a la lesión de la motoneurona: excitotoxicidad⁶⁹, disfunción mitocondrial⁷⁰, agregación de proteínas⁷¹, estrés del retículo endoplasmático⁷², y alteraciones en la señalización de los astrocitos y la microglía^{73, 74}. De modo que una disminución efectiva del estrés oxidativo podría potencialmente mejorar múltiples facetas de la patobiología de la degeneración de motoneurona. Un meta-análisis de los tratamientos intentados en ratones con mutación de SOD1 concluyó que la terapia antioxidante era el tipo de fármaco que más aumentaba la supervivencia de los ratones⁷⁵. Sin embargo, los antioxidantes todavía no han demostrado ningún beneficio en los ensayos clínicos en pacientes⁷⁶.

3.5.2. Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias tienen un papel central en la producción de energía intracelular, la homeostasis del calcio y el control de la apoptosis. Hay evidencias de que la disfunción mitocondrial está implicada en la patogenia de la ELA. En ratones mutantes SOD1, la proteína mutada se acumula en vacuolas en el espacio intermembranoso mitocondrial⁷⁷, y muestra un aumento en la adhesión a la parte exterior de la membrana dependiente de la edad. Se postula que este hecho conduce a la disfunción de las organelas selectivamente en la médula espinal por impedir la entrada de proteínas⁷⁸. Se ha encontrado en tejidos de pacientes con ELA⁷⁹ y en modelos murinos mutantes SOD1⁸⁰ una función deficiente de la cadena respiratoria

asociada con daño oxidativo a proteínas y lípidos mitocondriales. Así, es posible que la alteración de la regulación de la generación de energía metabólica contribuya a la disfunción neuronal.

El almacenamiento de calcio esta alterado en las mitocondrias aisladas del SNC de ratones mutantes SOD1⁸¹, y puede aumentar la susceptibilidad de las motoneuronas a la alteración de la homeostasis del calcio asociada a la excitotoxicidad mediada por glutamato. También se ha encontrado en modelos de ELA estrés del retículo endoplasmático que puede producir una alteración en el intercambio de calcio entre el retículo y las mitocondrias⁸². Se piensa que la muerte celular en la ELA está mediada por la activación de caspasas y apoptosis. El daño mitocondrial podría contribuir a este proceso⁸³.

En pacientes con ELA se ha apreciado una morfología alterada de las mitocondrias en el músculo esquelético y en las motoneuronas medulares⁸⁴. En algunos modelos murinos mutantes SOD1 la vacuolización mitocondrial empieza durante el estadio presintomático de la enfermedad, sugiriendo que se trata de un evento temprano en la cascada patofisiológica de la lesión de la motoneurona⁷⁷. La morfología mitocondrial también está alterada en motoneuronas primarias y en células NSC-34 que expresan SOD1 mutante⁸⁵. El transporte axonal de mitocondrias está afectado en los modelos experimentales de ELA, y es posible que una reducción en el contenido de mitocondrias en la parte distal del axón, combinada con la afectación de la función mitocondrial, conduzca a la axonopatía *dying-back* que se ve en la ELA^{86, 87}.

3.5.3. Excitotoxicidad

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC y ejerce su función a través de una serie de receptores postsinápticos iónico y metabotrópicos. La señal excitadora es apagada por la retirada del glutamato de la sinapsis por los transportadores de recaptación metabotrópicos. El más abundante es el EAAT2 (también conocido como SLC1A2 o GLT1). El daño resultante de la activación excesiva de los receptores de glutamato o excitotoxicidad puede estar causado por un

aumento en los niveles sinápticos de glutamato o por una sensibilidad aumentada de la neurona postsináptica al glutamato, resultado de la alteración de la homeostasis de la energía en la neurona o de la expresión del receptor del glutamato⁸⁸. La alteración de la homeostasis del calcio intracelular, con la activación secundaria de sistemas enzimáticos proteolíticos y generadores de radicales libres de oxígeno, y la perturbación de la función mitocondrial de la producción de ATP son los componentes clave de la excitotoxicidad⁸⁹.

Los receptores AMPA median la mayoría de la neurotransmisión activadora glutaminérgica en el SNC. Las motoneuronas son especialmente vulnerables a la excitotoxicidad mediada por AMPA, generando lesiones axonales distales. La permeabilidad al calcio del complejo del receptor AMPA está determinada fundamentalmente por la subunidad GluR2, que se edita post-transcripcionalmente en 586 Gln/Arg situado en el segundo dominio transmembrana, haciendo el complejo del receptor impermeable al calcio⁹⁰. Las características especiales de las motoneuronas, entre las que se incluye una expresión baja de GluR2⁹⁰ y de proteínas almacenadoras de calcio⁹¹, hacen estas neuronas especialmente vulnerables a la toxicidad mediada por los receptores AMPA.

Existen evidencias que implican a la excitotoxicidad como un mecanismo que contribuye a la lesión de la motoneurona en la ELA, aunque no hay una evidencia clara de que se trate de un mecanismo primario de la enfermedad. En algunos pacientes con ELA los niveles de glutamato están elevados en el líquido cefalorraquídeo⁹², y la expresión y actividad de EAAT2 están reducidas en las áreas afectadas del SNC⁹³⁻⁹⁵, aunque no está claro que esto sea causa o consecuencia de la pérdida de neuronas⁹⁶. Hay estudios electrofisiológicos en humanos que demuestran hiperexcitabilidad del sistema motor en estadios presintomáticos⁹⁷ y tempranos⁹⁸ de la ELA. La evidencia sugiere que la regulación de la permeabilidad al calcio de los receptores AMPA en el asta anterior de la médula puede estar alterada por una edición anormal de la subunidad GluR2 del receptor AMPA⁹⁹. Adicionalmente, se ha identificado recientemente un gen relacionado con la ELA que codifica D-aminoácido oxidasa (DAO). Esta enzima es responsable de la deaminación oxidativa de D-

aminoácidos, uno de los cuales (D-serina) es un activador y coagonista de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA)¹⁰⁰. Las mutaciones de DAO podrían potencialmente contribuir a la lesión excitotóxica de las motoneuronas.

En el modelo murino SOD1 mutado se aprecian varios hallazgos que también apuntan hacia que la excitotoxicidad tiene un papel en la patogenia de la ELA. Se ha observado una alteración en las propiedades electrofisiológicas y un aumento en la sensibilidad de las motoneuronas a la excitotoxicidad¹⁰¹, expresión alterada de la subunidad del receptor AMPA, expresión y actividad de EAAT2 reducidas¹⁰², aumento de la salida de glutamato de las terminaciones de los nervios de la médula espinal¹⁰³, reducción en el ratio inhibitor-estimulador de las sinapsis de las motoneuronas¹⁰⁴ y pérdida de la regulación astrocítica de la expresión de GluR2 en las motoneuronas vecinas¹⁰⁵.

3.5.4. Agregación proteica

Un rasgo cardinal de la ELA es la presencia de agregados patológicos de proteínas, identificados como inclusiones ubiquitinadas¹⁰⁶⁻¹⁰⁸, siendo TDP-43 su constituyente principal¹⁰⁹. Es frecuente observar diversas alteraciones en los neurofilamentos ^{107, 110}. Se aprecian inclusiones de SOD1 tanto en pacientes con ELA familiar con mutación en este gen¹¹¹ como en esporádica¹¹². También se pueden observar inclusiones citoplasmáticas de FUS en algunos pacientes con ELA familiar asociada a FUS^{113, 114}. Las proteínas que se encuentran en los agregados en la ELA proporcionan pistas importantes acerca de la patogénesis de la enfermedad. La pérdida del TDP-43 nuclear y su agregación en depósitos citoplasmáticos pueden ser procesos patogénicos claves en la ELA familiar y esporádica. La afectación de los neurofilamentos sugiere que su disfunción es importante en algunas formas de ELA. El aumento en la fosforilación de los neurofilamentos en las motoneuronas puede contribuir al enlentecimiento que se ha constatado en el transporte axonal^{115, 116}. Recientemente se ha detectado una alteración en el gen UBQLN2 que condiciona una expresión defectuosa de ubiquilina 2 que, a su vez, produce una disfunción del sistema ubiquitina-proteasoma. Esta disfunción produce una incapacidad de dicho

sistema para destruir proteínas siendo, probablemente, el evento causal generador de los depósitos que se observan en la ELA⁴⁰.

3.5.5. Alteración en la regulación del tráfico endosómico

La gran longitud de los axones de las motoneuronas las hace especialmente sensibles a las alteraciones en la red que regula el tráfico de los endosomas. Se han identificado múltiples mutaciones relacionadas con la ELA que afectan este mecanismo celular como la mutación en el gen que codifica la alsina¹¹⁷, VAPB¹¹⁸, optineurina¹¹⁹, CHMP2B^{120, 121}, VCP^{122, 123} o FIG4¹²⁴.

3.5.6. Alteración del transporte axonal

Las motoneuronas son células extremadamente polarizadas con largos axones que requieren un adecuado flujo de componentes (RNAm, proteínas, organelas) tanto de modo anterógrado como retrógrado para su buen funcionamiento. Tanto en el modelo murino de SOD1 mutado^{86, 125-127} como en pacientes¹²⁸⁻¹³⁰ se han encontrado diversas alteraciones que afectan este transporte. La alteración del transporte retrógrado apoya la teoría *dying-back* de la enfermedad que afirma que la enfermedad se origina en una alteración axonal. La alteración del transporte anterógrado combinada con la disfunción de las mitocondrias puede provocar una disminución en la generación de energía, especialmente en el extremo distal del axón.

3.5.7. Inflamación

Aunque la ELA no es primariamente una enfermedad autoinmune, hay un considerable cuerpo de evidencia que apunta a que la inflamación juega un papel en su patogenia. En el SNC de pacientes con ELA se puede apreciar activación de la microglía e infiltrado linfocitario que producen citoquinas inflamatorias con interleukinas, COX-2, TNF α y MCP-1¹³¹⁻¹³⁴; en el líquido cefalorraquídeo hay IL-8 y

MCP-1¹³⁵, signos bioquímicos de activación de la respuesta inmune en la sangre¹³⁶ y el complemento está activado¹³⁷.

3.5.8. Estrés del retículo endoplasmático

Como ya se ha explicado, los agregados de proteínas intracitoplasmáticas son una de las características histopatológicas típicas de la ELA. La alteración de la conformación de las proteínas induce la ruta de respuesta de estrés del retículo endoplasmático que corrige estas alteraciones mediante la acción de chaperonas¹³⁸ y puede llegar a suprimir la translación proteica y su degradación en el retículo¹³⁹. Aunque estos mecanismos son inicialmente citoprotectores, su activación continuada puede llevar a la célula a entrar en apoptosis¹⁴⁰. En los pacientes con ELA se ha encontrado elevación de algunos marcadores de activación de esta ruta¹⁴¹ y en un modelo murino de SOD1 mutada en el que se eliminó uno de los factores de transcripción clave de esta ruta (X-box binding protein-1) se obtuvo un aumento considerable de su supervivencia¹⁴².

3.5.9. Alteración en la regulación del procesamiento y transcripción del RNA

La atención en el procesamiento y transcripción del RNA como mecanismo etiopatogénico de la ELA vino determinada por la identificación de TDP-43 como componente importante de las inclusiones ubiquitinadas de la ELA¹⁰⁹, así como la descripción de mutaciones en FUS como alteración genética presente en un 4% de los casos familiares de ELA y 1% de los esporádicos. Ambas proteínas tienen un papel importante en la regulación de la transcripción del RNA y en su procesamiento¹⁴³. Adicionalmente, se han encontrado marcadores elevados de oxidación de RNA en pacientes con ELA⁶³.

3.5.10. Déficits de factores neurotróficos

Los factores tróficos tienen un papel importante en el desarrollo, la plasticidad y la neurogénesis en el sistema nervioso central, así como en la reparación de sus lesiones¹⁴⁴. Estas propiedades los postulan como un posible factor patogénico en la ELA. Se ha observado una disminución en los niveles de factores neurotróficos (CTNF, BDNF, GDNF e IGF-1) en muestras post-mortem de pacientes y en modelos in vitro de la enfermedad¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Así mismo, ratones con delección del elemento de respuesta a hipoxia del promotor de VEGF desarrollan un fenotipo de ELA¹⁴⁸. Además, el BDNF, CNTF, GDNF, IGF-1, VEGF, HGF, eritropoyetina y G-CSF se han utilizado con buenos resultados en modelos animales e in vitro de ELA, demostrando casi todos ellos un efecto protector contra la muerte celular -sea por apoptosis o por excitotoxicidad-, el mantenimiento de la placa neuromuscular, y mejora en la supervivencia de los ratones¹⁴⁴.

3.5.11. Papel de las células no neuronales

Un concepto importante de relativamente reciente elaboración y creciente importancia es el que afirma que la muerte celular no es un proceso centrado únicamente en las propias motoneuronas: las células del microambiente que rodea a las motoneuronas tienen un papel crucial. En ratones quiméricos que expresaban SOD1 mutado únicamente en la glía, las motoneuronas normales desarrollaron signos de ELA¹⁴⁹. En otro experimento en el que las motoneuronas tenían el SOD1 mutado se correlacionó positivamente la supervivencia de las mismas, así como la supervivencia de los ratones quiméricos, con la proporción de células no neuronales que no tenían el SOD1 mutado.

En otro modelo, cuando el SOD1 mutado fue eliminado de la microglía no se alteró el inicio de la enfermedad, pero la progresión de la misma se enlenteció en un 50%¹⁵⁰, sugiriendo que el inicio de la enfermedad y su progresión y propagación representan dos fases distintas de la misma, poniendo de relieve nuevas posibilidades terapéuticas.

Aunque la expresión restringida a los astrocitos de SOD1 mutado no produce un fenotipo de ELA¹⁵¹, el silenciamiento selectivo del gen mutante en los astrocitos sí enlentece significativamente la progresión de la enfermedad en ratones con SOD1 mutado¹⁵². En cocultivos, los astrocitos procedentes de ratones con SOD1 mutado son tóxicos tanto para motoneuronas de cultivos primarios como para motoneuronas derivadas de células embrionarias¹⁵³. Este hallazgo indica que los astrocitos que expresan el SOD1 mutado o bien ejercen efectos tóxicos o son incapaces de proporcionar el soporte trófico que requieren las motoneuronas.

Se han obtenido resultados contradictorios cuando la expresión de SOD1 mutado se limitó a las motoneuronas. La cantidad de SOD1 mutado que se expresa parece ser crucial para desencadenar el daño celular e iniciar la enfermedad. Los ratones que no tienen SOD1^{G37R} en los oligodendrocitos tienen un curso de la enfermedad más agresivo que el de los ratones cuyos oligodendrocitos sí expresan el SOD1 mutado, y ese fenotipo se acompaña de una expresión reducida de IGF-1¹⁵⁴. La expresión exclusiva de SOD1^{G93A} en las células de Schwann no altera a las motoneuronas, y aumentar la expresión de SOD1 mutado en las células de Schwann no exacerba el fenotipo de la enfermedad¹⁵⁵. De modo que, aunque la expresión de SOD1 en los oligodendrocitos y las células de Schwann altera las propiedades de dichas células, no parece ser suficiente para causar la degeneración de las motoneuronas.

Un estudio reciente examinó cómo las propiedades de los astrocitos cambian en presencia de SOD1 mutado y contribuyen a la degeneración de las motoneuronas¹⁵⁶. Se identificaron como los componentes claves del efecto tóxico de los astrocitos sobre las motoneuronas, la disminución del soporte metabólico de la motoneurona por disminución de la liberación de lactato por parte de los astrocitos y la activación de la ruta de señalización pro-NGF – receptor p75. Se pudo eliminar esta toxicidad aumentando el aporte de lactato a las motoneuronas, disminuyendo los niveles de NGF y bloqueando el receptor p75.

3.5.12. Resumen

En la figura 1 se encuentran resumidos todos los mecanismos patogénicos implicados en la ELA. Como puede observarse, la ELA es una enfermedad compleja en cuya generación intervienen tanto las alteraciones de varias rutas celulares de las motoneuronas como los trastornos de su interacción con las células vecinas no neuronales. La microglía activa la cascada inflamatoria mediante la secreción de MCP-1 y otras citoquinas. Los astrocitos contribuyen al daño de las motoneuronas mediante varios mecanismos, incluyendo la liberación de mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO) y PEG2, una reducción en la expresión y actividad de EAAT2 –el transportador de la recaptación de glutamato-, una reducción en la liberación de lactato, y la activación de la señalización del receptor pro-NGF-p75. Además, las motoneuronas sufren también una alteración en la transcripción y procesamiento del RNA que, junto con la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), contribuye a generar una conformación aberrante de las proteínas. Estas proteínas aberrantes pueden formar agregados que llevan a una alteración en la función de los proteasomas y a estrés del retículo endoplasmático y, finalmente, a la activación de las rutas de autofagia y apoptosis. La alteración de la función de las mitocondrias y de la regulación del manejo del calcio son dos componentes importantes del daño de la motoneurona que también llevan a la activación de la cascada apoptótica. La alteración del transporte axonal puede contribuir a un déficit energético en la parte distal del axón y a la axonopatía “dying-back” que se observa en la ELA. Finalmente, las motoneuronas pueden producir y secretar subunidades del complemento que constituyen señales importantes de estrés celular para las células vecinas¹⁵⁷.

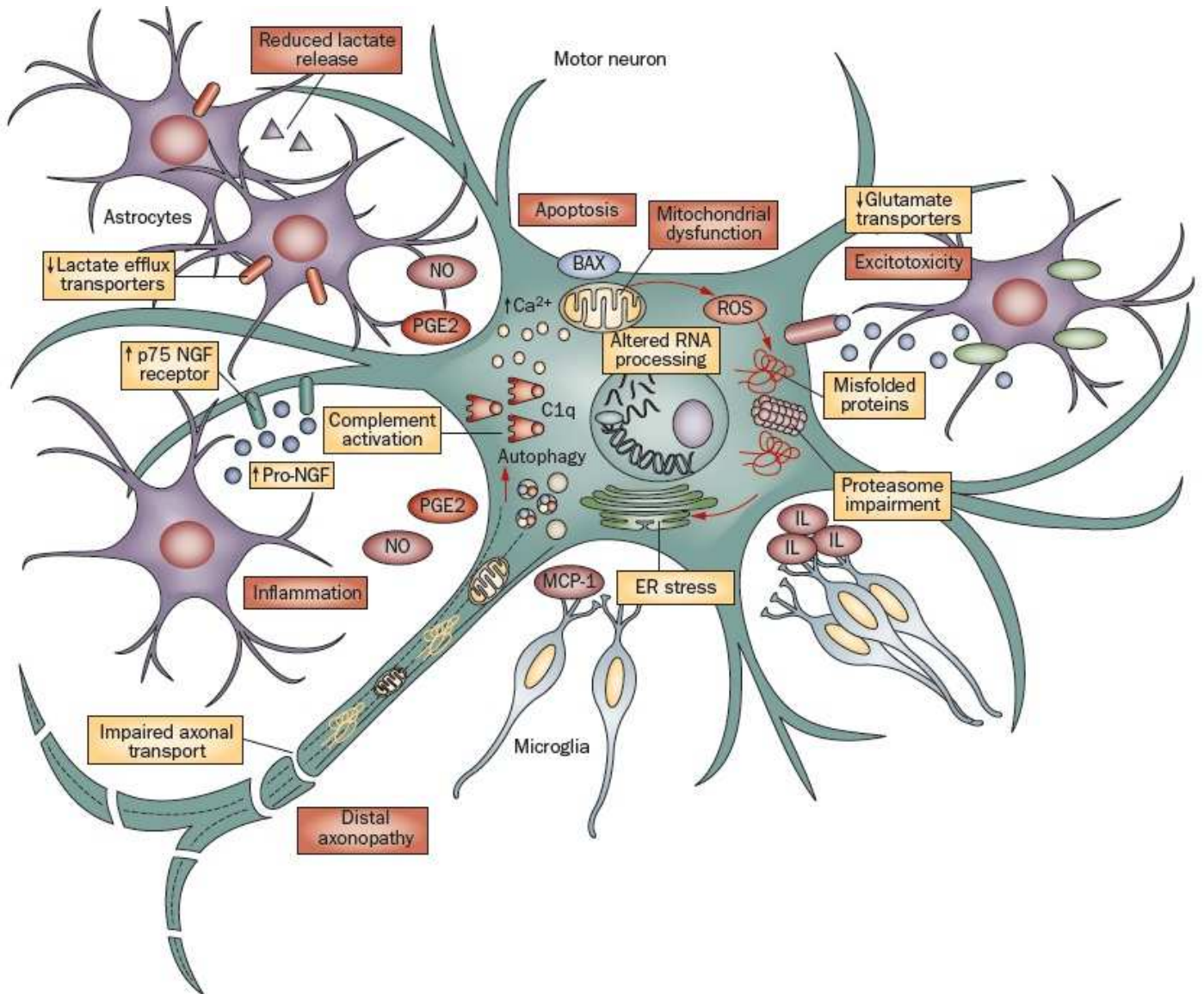


Figura 1. Mecanismos moleculares de daño de la motoneurona en la ELA¹⁵⁷.

3.6. TRATAMIENTO

El tratamiento de los afectados de ELA debe ser integral, multidisciplinar y comenzar desde el momento mismo de la comunicación del diagnóstico al paciente y a sus familiares o potenciales cuidadores. Teniendo en cuenta el carácter progresivo de la enfermedad y su pronóstico, además del tratamiento etiopatogénico, es fundamental el tratamiento sintomático adecuado, con el fin de mejorar la calidad de vida del paciente¹⁸.

El inicio precoz del tratamiento integral requiere, en primer lugar, un diagnóstico también precoz de la enfermedad, siendo deseable la reducción del tiempo promedio que transcurre desde el inicio de los síntomas y el diagnóstico⁵⁶. La Federación europea de sociedades neurológicas¹⁵⁸, la Academia americana de Neurología^{159, 160} y el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad español¹⁸ han desarrollado guías clínicas basadas en la evidencia para el tratamiento de los pacientes con ELA que han supuesto una mejora significativa de los síntomas incapacitantes para los pacientes¹⁶¹, y han demostrado una mejoría en la calidad de vida y en la supervivencia¹⁶².

A pesar de que se han realizado más de 30 ensayos fase II y fase III^{163, 164} y de haber probado al menos en ensayos fase I más de 48 compuestos¹⁶⁵ que poseían fundamento fisiopatológico (figura 2) y habían presentado resultados esperanzadores en los ensayos en modelos in vitro y murinos, únicamente el Riluzol ha demostrado modificar el curso de la enfermedad¹⁶⁶. El Riluzol fue capaz de aumentar la supervivencia de los pacientes en 3-6 meses en dos ensayos clínicos aleatorizados y controlados^{167, 168}. Parece que el beneficio obtenido con este fármaco fue superior en los hospitales con unidades especializadas multidisciplinarias de ELA que en otros hospitales¹⁶⁹ y en los pacientes con una afectación funcional moderada¹⁷⁰.

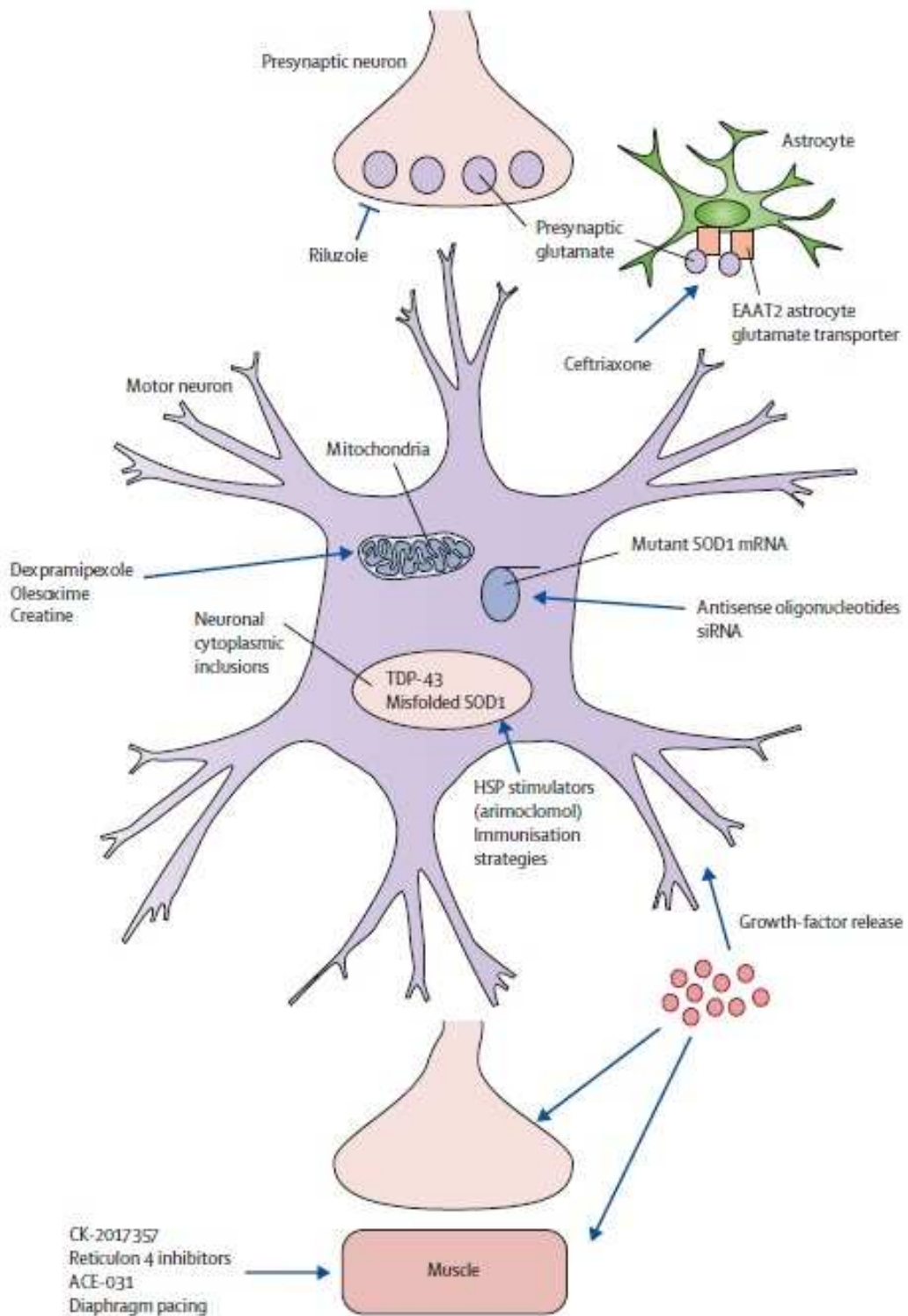


Figura 2 Objetivos terapéuticos y fármacos ensayados¹⁷¹.

La falta de resultados positivos se ha relacionado con el insuficiente conocimiento de los aspectos etiopatogénicos, con la falta de modelos animales adecuados de ELA esporádica para realizar estudios preclínicos (se utiliza fundamentalmente el modelo transgénico para la mutación de SOD como modelo de enfermedad), con la falta de biomarcadores que sean predictivos de supervivencia y con la necesidad de enfoques terapéuticos que engloben múltiples dianas patogénicas^{16, 172}.

Por este motivo, el tratamiento sintomático continúa siendo la base fundamental del manejo de los pacientes de ELA¹⁷³. Y para algunos pacientes esos tratamientos no solo alivian los síntomas, sino que también mejoran su supervivencia y su calidad de vida^{159, 160}. El cuidado óptimo de los pacientes con ELA se realiza en unidades multidisciplinarias donde los psicoterapeutas, terapeutas ocupacionales, logopedas, neumólogos, gastroenterólogos y trabajadores sociales colaboran con los neurólogos para guiar el tratamiento sintomático durante el transcurso de la enfermedad¹⁶². Los modelos multidisciplinarios de tratamiento aumentan la supervivencia, reduciendo el riesgo de muerte en un 45% a los 5 años. En comparación con los pacientes tratados en servicios de neurología general, los pacientes tratados en unidades especializadas tienen una mejor calidad de vida, apreciándose los beneficios desde la primera visita¹⁶².

La función respiratoria y la nutrición son las principales preocupaciones para los pacientes con ELA, siendo la insuficiencia respiratoria la principal causa de muerte¹⁵⁸. La ventilación no invasiva mejora la calidad de vida de los pacientes y aumenta su supervivencia¹⁷⁴. Las recomendaciones para instituir la ventilación no invasiva se basan en una combinación de síntomas (disnea y ortopnea) y signos de debilidad de la musculatura respiratoria como una desaturación significativa en la oximetría nocturna, aumento de la presión parcial de CO₂ ≥ 65 mm Hg y reducción de la capacidad vital forzada (CVF) por debajo del 80% o sniff nasal de menos de 40 cm H₂O^{158, 173}. Los pacientes con una afectación bulbar importante y sialorrea pueden no tolerar la ventilación no invasiva siendo, por tanto, de crucial importancia un adecuado manejo de las secreciones⁴³. La ventilación invasiva vía traqueotomía es una opción

en los pacientes que no toleran la ventilación no invasiva, o cuando esta forma de ventilación ya no es suficiente por la progresión de la debilidad muscular¹⁶⁰. Aunque la ventilación invasiva aumenta la supervivencia, tiende a no utilizarse en la mayoría de los países por la dificultad práctica en aplicarla, el gasto y la profunda disminución en la calidad de vida que supone¹⁷⁵. Como tratamiento sintomático, la morfina subcutánea proporciona un gran alivio a los pacientes que tienen disnea de reposo¹⁷⁶.

La malnutrición es un determinante fundamental del pronóstico¹⁷⁷. El desarrollo de la malnutrición en la ELA es multifactorial, incluyendo la disminución en la ingesta provocada por la disfagia así como hipermetabolismo^{160, 178}. Entre un 50% y un 60% de los pacientes con ELA tienen un estado hipermetabólico¹⁷⁹ que parece mantenerse estable durante el curso de la enfermedad, y es independiente de la edad, el sexo y la masa no grasa¹⁷⁷. El aumento del metabolismo se asocia con disminución de la supervivencia¹⁷⁷. La inserción de un tubo de gastrostomía percutáneo asegura una ingesta calórica y de fluidos suficiente, y debe ser ofrecida a los pacientes que tienen una pérdida significativa de peso, incluso en ausencia de disfagia¹⁵⁸. La colocación del tubo de gastrostomía debe ser abordada pronto con el paciente porque la morbilidad del procedimiento aumenta cuando la capacidad vital forzada es inferior al 50%¹⁶⁰.

Para mejorar la calidad de vida de los pacientes es esencial estar atento a los múltiples síntomas que pueden aparecer durante el desarrollo de la enfermedad¹⁸⁰ (ver tabla 2). La fase terminal de la ELA puede asociarse a inquietud, ansiedad, dolor y disnea, y son necesarios cuidados paliativos multidisciplinares bien coordinados⁴³.

3.7. PRONÓSTICO

El análisis de muestras numerosas de pacientes extraídas de poblaciones pertenecientes a ensayos clínicos y de los registros refleja consistentemente que la supervivencia media desde el inicio de los síntomas para la ELA es de 2-3 años para los casos de inicio bulbar y 3-5 años para los de inicio medular¹⁶. Los grandes estudios clínicos de cohortes han mostrado una supervivencia a los 3 y 5 años del 48% y el

Tabla 2 Tratamientos sintomáticos en la ELA

Debilidad y discapacidad	Sialorrea
Aparatos ortopédicos	Antidepresivos anticolinérgicos (ej. amitriptilina)
Fisioterapia	Anticolinérgicos (ej. bromuro de glicopirronio)
Ayudas adaptativas (ej. andador, silla de ruedas)	Toxina botulínica
Disfagia	Irradiación de las glándulas salivares
Valoración por logopeda y nutricionista	Productos de higiene bucal
Modificaciones de la dieta	Aspiración
Técnicas para tragar con seguridad	Saliva espesa
Tubo de gastrostomía	Remedios naturales (ej. papaya)
Disnea y tos débil	Asegurar una hidratación adecuada
Soporte ventilatorio	Nebulizaciones de suero fisiológico y de N-acetilcisteína
Morfina o benzodiacepinas	Aspiración
Fisioterapia torácica	Higiene bucal
Máquina de aspiración	Depresión y ansiedad
Técnicas de tos manualmente asistida	Consejo
Dolor (dolor musculoesquelético y calambres, fasciculaciones y espasticidad, dolor por inmovilidad)	Benzodiacepinas
Fisioterapia	Antidepresivos
AINEs	Labilidad emocional
Relajantes musculares (baclofen, toxina botulínica)	Educar a los pacientes y cuidadores
Anticonvulsionantes (ej. gabapentina)	Amitriptilina
Cambios posturales y cuidado de las zonas de presión	Benzodiacepinas
Opioides	Dextrometorfano / sulfato de quinidina
Colchones antiescaras	Alteración del sueño
Disartria	Tratar el problema subyacente
Valoración por logopeda	Revisión neumológica
Ayudas a la comunicación	Ventilación no invasiva
Educación de la familia y cuidadores	Benzodiacepinas, antidepresivos tricíclicos
Cambios cognitivos (disfunción del lóbulo frontal o demencia)	Estreñimiento
Explicar los síntomas a los familiares	Cambios dietéticos (ej. aumentar la ingesta de líquidos y fibra)
Antidepresivos	Usar formulaciones ricas en fibra, salvado o no digeribles
	Laxantes orales (Movicol o supositorios)

24% respectivamente, con un 4% de los pacientes vivos durante más de 10 años¹⁸¹,¹⁸². Sin embargo, la supervivencia a 5 años comunicada en los estudios poblacionales es mucho menor, moviéndose en un rango de 4-30%²⁰.

Los factores pronósticos que emergen consistentemente de los estudios poblacionales y de las cohortes clínicas son: el lugar de inicio de la enfermedad (bulbar vs. medular)¹⁸³⁻¹⁸⁷, edad al inicio de los síntomas¹⁸⁴⁻¹⁸⁹, el tiempo desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico¹⁸⁷, el descenso de la capacidad vital forzada basal^{184, 186, 190}, categoría de El Escorial al diagnóstico^{183, 189} y el uso de riluzol^{169, 186}.

4. LA TERAPIA CELULAR COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA

Las células madre o células “stem” se definen por su capacidad de autorrenovación y diferenciación en, al menos, un tipo celular maduro. Otra característica de las células madre es que no tienen estructuras específicas de tejido que les permitan desarrollar funciones especializadas, pero son las mediadoras de la reconstitución funcional “in vivo”. Aunque las células madre se pueden subclasificar atendiendo a su tejido de origen o a su potencial para diferenciarse en uno o más tipos específicos de células maduras, su caracterización es difícil y está mal definida. Algunas células madre son más pluripotentes que otras y se admite que el potencial de diferenciación y autorrenovación disminuye a medida que se avanza en el desarrollo embrionario. Así la única célula capaz de diferenciarse en todas las células y tejidos de un individuo es el cigoto (célula madre totipotente), ya que puede generar todos los tejidos del embrión, del feto y los extraembrionarios, como la placenta y el cordón umbilical^{191, 192}. Las células madre embrionarias proceden de la masa celular interna del blastocisto y pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales embrionarias, ectodermo, mesodermo y endodermo; son por tanto células madre

pluripotentes pero no dan lugar a un individuo completo. Las células madre presentes en los tejidos tras el nacimiento (células madre del adulto o somáticas), tienen su capacidad de diferenciación restringida a las células de la capa embrionaria de la que proceden. Son responsables de la reparación de ese tejido a lo largo de toda la vida, por lo que se han denominado células madre tisulares¹⁹³. Las células madre del adulto más conocidas y estudiadas son las células madre hematopoyéticas, pero también existen en el sistema nervioso, el hígado, el intestino, la piel o el pulmón. En la última década hemos asistido a una avalancha de nuevos conocimientos sobre la biología de las células madre que desafían los dogmas clásicos del desarrollo y potencialidad celular^{192, 194-197}. Se ha generado un enorme interés en la posibilidad de usar las células madre como fuente de reposición / reparación celular en enfermedades isquémicas, degenerativas, genéticas o neoplásicas y como fuente de efectos tróficos de carácter mecánico o humoral.

4.1. Las células madre del adulto

Según las teorías del desarrollo hasta ahora admitidas, el potencial de diferenciación de las células madre del adulto está restringido a la capa embrionaria de la que proceden. La programación de las células madre del adulto parece producirse durante el desarrollo embrionario y se perfila dentro del tejido en el que se asientan, de modo que fabrican, por defecto, las células de dicho tejido. A finales de los años 90, se desarrollaron estudios que demostraban una versatilidad previamente no reconocida en las células madre del adulto, acuñándose el concepto de “plasticidad”. En los experimentos animales más demostrativos, células procedentes de la médula ósea adquirirían características fenotípicas de tejidos de otra capa embrionaria como el sistema nervioso central o el hígado cuando eran trasplantadas en esos tejidos y sometidas a la influencia de otro micro-medio ambiente^{191, 194, 197, 198}.

Es motivo de controversia si los fenómenos de plasticidad son debidos a la presencia en la médula ósea de células madre pluripotenciales tipo MAPCs (células progenitoras multipotentes del adulto), si por el contrario las células madre hematopoyéticas son capaces de reprogramación genética para transformarse en

células de otros tejidos (transdiferenciación) en respuesta a señales del micromedioambiente o estrés biológico, o si todo es consecuencia de la fusión de las células madre con las células locales formando células híbridas¹⁹⁹. En esta polémica son importantes los estudios que resaltan el decisivo papel que el microambiente o “nicho” local ejerce en el reclutamiento de las células madre circulantes hacia un tejido concreto, y en la generación de señales que inducen la activación de genes mediadores de la diferenciación, maduración y estabilidad funcional²⁰⁰. En este sentido, se considera que las lesiones tisulares favorecen la generación de dichas señales al liberar moléculas como el SDF-1 que son quimiotácticas para el CXCR4, su ligando específico situado en la superficie de las células madre hematopoyéticas^{191, 195}. Las características diferenciales entre los distintos tipos de células madre, en principio definidas por la actividad de gradientes temporales y espaciales de información posicional derivados del entorno en el que se localizan, pueden revertir cuando éstas son ubicadas en un nuevo nicho, readquiriendo la habilidad para generar propiedades celulares nuevas, incluyendo el potencial trófico celular. Estos estudios han generado unas enormes expectativas al sugerir que las células madre adultas de la médula ósea o circulantes podrían utilizarse como fuente de reposición/soporte celular para tratar una gran variedad de enfermedades de tejidos no hematopoyéticos. Los datos más claros en este aspecto muestran que las células madre infundidas también ejercen un efecto beneficioso indirecto (“paracrino”), al proporcionar factores tróficos (antiapoptóticos, angiogénicos, anti-inflamatorios), que protegen a las células dañadas, y otras señales que estimulan la proliferación de los progenitores endógenos²⁰¹⁻²⁰⁴. Nuestro grupo ha aportado datos consistentes con la potencialidad neural de la célula stem murina, y también con su capacidad neuroprotectora, sin producir efectos estructurales o funcionales adversos²⁰⁵⁻²⁰⁸. La infusión de células madre autólogas procedentes de la médula ósea podría estar indicada para reparar daños tisulares agudos, como los causados por fenómenos isquémicos o por toxinas. En estas patologías también se han investigado con resultados esperanzadores células madre procedentes de la membrana amniótica, el cordón umbilical, el tejido adiposo o incluso la pulpa dental^{192, 205, 209-215}. En las enfermedades genéticas y en las degenerativas, se podrían utilizar células madre alogénicas o células madre autólogas modificadas “in

vitro”, no solo para reponer células sino como vehículo óptimo de factores tróficos protectores o de expresiones génicas dirigidas en los tejidos.

4.2. Células madre neurales en modelos de degeneración espinal

En las enfermedades neurodegenerativas de la motoneurona, tal como la esclerosis lateral amiotrófica y la distrofia muscular espinal, las motoneuronas mueren progresivamente durante un corto período de tiempo. Estas enfermedades clínicamente se manifiestan como una progresiva pérdida de la fuerza muscular y atrofia muscular, lo cual conduce a una parálisis y muerte prematura. Como ya se ha dicho, en pacientes de ELA la muerte suele ocurrir entre 3 y 5 años después del inicio de los síntomas clínicos^{181, 182}. Las terapias farmacológicas intentadas hasta el momento no detienen la progresión en los déficits ni restauran la función motora perdida^{172, 216, 217}.

Este desalentador panorama contrasta con los esperanzadores resultados obtenidos en diferentes modelos animales de muerte neuronal, en los que se trasplantaban progenitores neurales en las áreas dañadas de la médula espinal. Esta estrategia puede ser un prometedor enfoque para modificar la historia natural de estas enfermedades, protegiendo a las motoneuronas de la degeneración e incluso restaurando la función motora^{149, 205, 207, 208, 211, 212, 218-225}. Aunque varios autores han publicado que es factible el trasplante de progenitores neurales obtenidos de cerebros de adultos y de embriones en modelos de lesión medular con resultados regenerativos positivos, todos ellos coinciden en la limitada capacidad de diferenciación de las células trasplantadas en la médula espinal²²⁶⁻²²⁸. La posible aplicación de esta terapéutica en humanos presenta dificultades casi insalvables. La primera, derivada de la obtención de progenitores neurales humanos con calidad y cantidad adecuadas para su uso terapéutico. Estas células deben proceder de tejido nervioso viable (fetos o células derivadas de biopsias), y su aplicación requeriría la inmunodepresión permanente tras el alotrasplante^{211, 212}.

Otro tipo de trabajos han demostrado que el trasplante de células derivadas de una línea neuronal humana, obtenidas a partir de una línea celular de teratocarcinoma humano, retrasa el inicio de la sintomatología asociada a la ELA en un modelo animal de la SOD1^{218, 229, 230}. En un modelo de quimerismo celular en ratón, se ha demostrado que células no neurales de genotipo silvestre en la sustancia gris de la médula espinal prolongan la supervivencia de neuronas motoras mutantes de ratones SOD1¹⁴⁹.

En estos trabajos se demuestra pues, que la presencia de células sin la mutación de las células del huésped, prolonga la supervivencia de la motoneuronas espinales en modelos animales de degeneración de motoneuronas.

4.3. Células madre de la médula ósea en enfermedades neurodegenerativas.

Se ha estudiado el potencial neural de células madre derivadas de médula ósea en el cerebro, y múltiples trabajos sugieren que son capaces de diferenciarse en neuronas, astrocitos y microglia^{196-198, 231-233}. El potencial regenerador de las células de la médula ósea en lesiones desmielinizantes de la médula espinal también ha sido explorado²³⁴⁻²³⁶. Sin embargo, no está del todo claro cuál es el mecanismo básico que subyace en la reparación de las motoneuronas en la ELA. Dada la complejidad patogénica de la enfermedad, es posible que la terapia celular determine cambios a varios niveles. Además del eventual efecto regenerador, recientemente se ha puesto un especial énfasis en el impacto favorable de las células trasplantadas sobre el micromedioambiente, proporcionando células de la microglía y astrocitos no disfuncionales, y como fuentes de factores neurotróficos que induzcan una mayor supervivencia y/o disminuyan la muerte de las motoneuronas^{201, 211, 212, 237, 238}.

Si los efectos beneficiosos encontrados son debidos a un subgrupo celular concreto es motivo de controversia. Aunque las células madre mesenquimales tienen capacidad multipotente in vitro y son conocidas sus propiedades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras, otros tipos celulares como las MAPC, las células madre hematopoyéticas, las “very small embryonic-like stem cells” (VSELs)²³⁹, o los precursores de las células dendríticas, identificadas en la fracción mononuclear de la

médula ósea, también tienen capacidad multipotente o inmunomoduladora in vitro, por lo que no es descartable que en mayor o menor medida todas sean necesarias para una acción multifactorial. Estos factores son importantes a la hora de considerar el diseño de ensayos clínicos procedentes de médula ósea, ya que la selección de determinados subgrupos celulares podría alterar los eventuales efectos esperados en base a la experimentación animal^{202, 203, 205, 211, 212}.

Otras preguntas por resolver incluyen la fuente idónea de células madre, el tipo celular elegido, su cantidad óptima de células a infundir o la vía de administración más eficaz^{203, 204, 220, 240-242}. Así, además de la médula ósea, el uso de células madre de la membrana amniótica, el cordón umbilical, la pulpa dental o la grasa está siendo investigado con éxito^{205, 209-211, 213-215, 225, 243}. Por otro lado, es conocido que en la médula ósea coexisten un grupo heterogéneo de células madre con diversas potencialidades de autorenovación y especificación, incluyendo células madre hematopoyéticas, mesenquimales, VSELS²³⁹ y MAPC. Este es un factor importante a considerar en el diseño de ensayos clínicos con células madre procedentes de la médula ósea, ya que la selección de determinados subgrupos celulares podría limitar o ampliar la eficacia para una patología concreta, y esto es motivo de estudio^{191, 192, 194, 244, 245}.

Tampoco está del todo clara la vía óptima de infusión de las células madre, o si esta podría ser diferente según las patologías a tratar. En los últimos años se han generado datos experimentales que sostienen el beneficio de la administración de células madre de médula ósea humanas por vía intratecal en modelos animales de ELA^{204, 246}. También se está explorando la vía intratecal con el objetivo de reparar motoneuronas en pacientes con enfermedades neurodegenerativas²⁴⁷. La vía intratecal ya ha sido utilizada en humanos de forma segura, como vehículo de infusión de proteínas, fármacos o factores neurotróficos²⁴⁸⁻²⁵⁰. Algunos autores defienden esta vía de infusión celular en la terapia celular de enfermedades neurodegenerativas, dado que es una técnica de rutina en la práctica médica, sus efectos secundarios son leves y transitorios y mucho menos relevantes que la inyección intraespinal^{204, 246, 247}. Sin embargo, es preciso tener más datos sobre su seguridad y particularmente de su

eficacia, demostrando que la barrera hemato-encefálica no es un problema para esta modalidad de infusión.

En conjunto, los resultados preliminares obtenidos en modelos animales, convierten a la terapia con células madre en un prometedor y novedoso enfoque que puede abrir nuevas vías terapéuticas en una enfermedad irremediablemente mortal como la ELA, que actualmente no dispone de tratamientos eficaces, y que dada su condición de enfermedad huérfana requiere con urgencia el desarrollo de nuevos ensayos clínicos^{16, 163}.

Los investigadores de nuestro grupo liderados por el Prof. Salvador Martínez en el Instituto de Neurociencias de Alicante, junto con el Prof. Moraleda en el HUVA, han desarrollado una línea experimental cuyo objetivo es establecer los fundamentos científicos del uso de células madre derivadas de la médula ósea, como terapia celular en pacientes con ELA, cuyos resultados han sido publicados^{205-208, 225}. Para ello se puso a punto un modelo animal de enfermedad de la motoneurona, y estudiamos la capacidad de las células madre de la médula ósea inyectadas en la médula espinal del animal para enlentecer la progresión de la enfermedad. La ventaja del uso de células madre de la médula ósea es la posibilidad de realizar el trasplante en pacientes de ELA y MSD, obteniendo las células del propio paciente (autotrasplante), eliminando el problema del rechazo u otras reacciones inmunes y de la disponibilidad de donantes^{205, 211}.

El animal modelo empleado en estos estudios, *muscle deficient (mdf)*, posee una mutación espontánea en el cromosoma diecinueve, que determina un fenotipo cuya manifestación clínica es una progresiva parálisis y atrofia de la parte trasera del cuerpo²⁵¹. Las alteraciones patológicas son muy similares a la ELA y consisten principalmente en degeneración de las motoneuronas acompañadas de astrogliosis. Este ratón ha sido propuesto como modelo genético de enfermedades como la ELA y MDS²⁵². Como se ha comentado, el propósito de nuestro trabajo fue estudiar el potencial de las células madre obtenidas de la médula ósea de animales adultos para mejorar la función motora y rescatar motoneuronas de la degeneración. Las células madre de la médula ósea se trasplantaron en la región L4-S1 de la médula espinal de

animales modelo de ELA (*mdf*) de entre 10 y 15 semanas de edad, en los cuales la sintomatología se manifestaba claramente. Después de un período de supervivencia los animales se sometieron a meticulosas pruebas funcionales, mediante test de comportamiento y medidas de electromiografía, y análisis de histología e inmunohistoquímica post-mortem ²⁵¹. Con respecto a los controles, los ratones trasplantados demostraron una mejoría de la función motora que se acompañó de un incremento significativo en la supervivencia de las motoneuronas en la médula espinal. El examen histológico e inmunohistoquímico reveló que las células madre inyectadas sobrevivían en la médula espinal, y que no existía un proceso de “transdiferenciación”, sino que conservaban marcadores de médula ósea y se disponían alrededor de las motoneuronas aportando factores neurotróficos (figura 3). Un análisis inmunohistoquímico (anti-GDNF) y molecular paralelo (expresión del gen GDNF por hibridación in situ, así como concentración de GDNF por ELISA), aportó evidencias de que el efecto estaba mediado por el factor GDNF (figura 4). También se realizaron estudios funcionales que demostraban una mejoría de la función motora, y el recuento de motoneuronas demostró un aumento muy significativo en la supervivencia de las motoneuronas en la médula espinal sacra de los animales tratados con respecto al grupo control. El mecanismo neurotrófico dependiente de GDNF se confirmó al desaparecer el efecto beneficioso del trasplante cuando la médula ósea utilizaba procedía de un ratón knock out para GDNF^{205, 206, 225}.

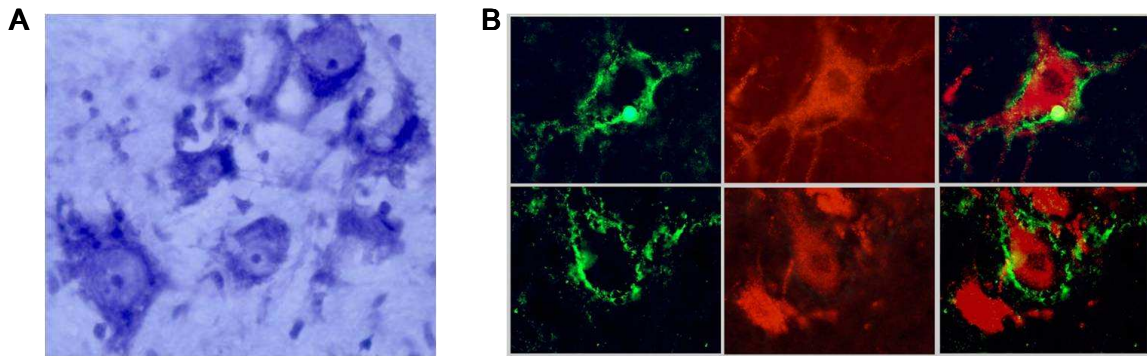


Figura 3 Disposición de las células de médula ósea alrededor de las motoneuronas. A: tinción de violeta cresil. B: células de médula ósea donante marcadas con GFP, motoneuronas marcadas retrógradamente con rodamina²⁰⁶.

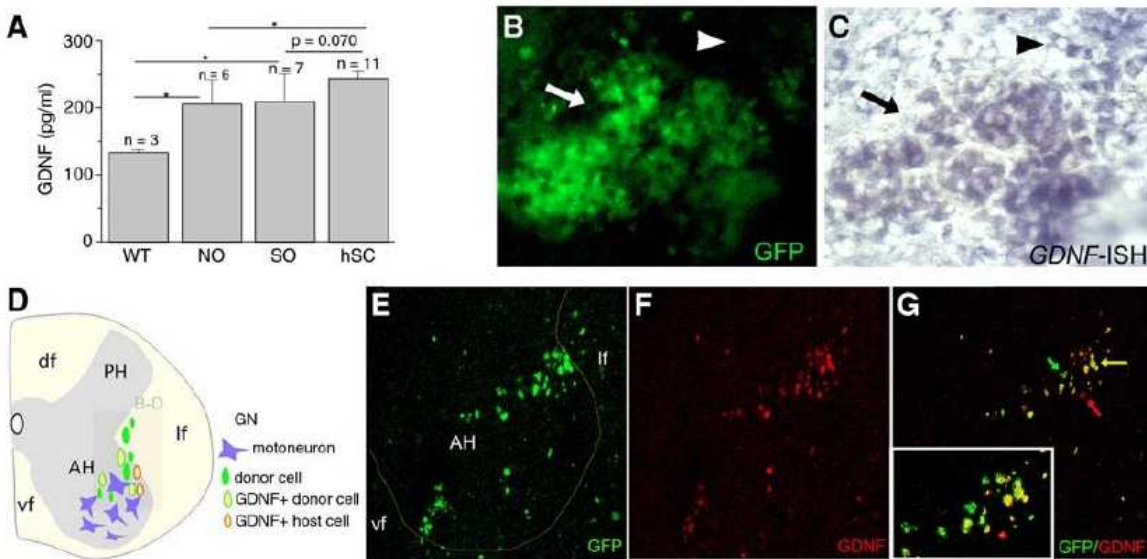


Figura 4 Neurotrofismo mediado por GDNF. Las células de médula ósea inyectadas migran al asta anterior (D) y secretan GDNF. A: GDNF medido por ELISA en ratones wild-type (WT), mdf sintomáticos no operados (NO), mdf operados a los que no se han inyectado células (SO), inyectados con células de médula ósea (hSC). B y C: expresión de GDNF por hibridación in situ en las células infundidas GFP positivas. E, F y G: secreción de GDNF por las células GFP positivas infundidas²⁰⁶.

4.4. Ensayos clínicos de terapia celular en pacientes con ELA.

En el momento de plantear nuestro estudio solo se había publicado un ensayo clínico de terapia celular en pacientes con ELA²⁵³. En este ensayo se incluyeron 7 pacientes con ELA de debut medular, con compromiso funcional severo de los miembros inferiores y leves de los superiores. Los pacientes no presentaban signos de insuficiencia respiratoria (CVF>50% y polisomnografía normal). Se obtuvo médula ósea de estos pacientes por punción de su espina ilíaca posterior. Se separaron las células adherentes (mesenquimales) y se expandieron en cultivo durante 3-4 semanas. El producto final obtenido se resuspendió en 2 ml de líquido cefalorraquídeo autólogo, que se inyectó directamente en la médula espinal, quirúrgicamente expuesta en sus niveles T7 a T9 mediante laminectomía. Se escogieron estos niveles primero porque, desde un punto de vista quirúrgico, el riesgo de producir una lesión de la médula ósea es menor que a niveles más rostrales. En segundo lugar, porque la hipotética reinervación neuronal a ese nivel tenía una mayor probabilidad de ser detectada debido a la menor distancia entre la médula y el músculo; y finalmente, porque cualquier evidencia de un aumento en el reclutamiento muscular no podía ser resultado de una lesión medular iatrogénica, como, por ejemplo, por hipertonía muscular. La duramadre fue abierta en su línea media y las células fueron inyectadas en la parte más central de la médula con una cánula asociada a una jeringa Hamilton²⁵³.

Ningún paciente experimentó eventos adversos severos como muerte, fallo respiratorio o déficits neurológicos permanentes. Los eventos adversos menores fueron: dolor intercostal (4 pacientes), que remitió en una media de 3 días (rango 1-6) desde la cirugía, y disestesias en las piernas (5 pacientes), que remitieron en un tiempo medio de 6 semanas (rango 1-8) tras la cirugía. Ningún paciente experimentó disfunción vesical o intestinal, o déficit motor de los miembros inferiores. No hubo complicaciones anestésicas. La Resonancia nuclear magnética realizada a los 3 y 6 meses del implante no mostró evidencia de cambios estructurales de la médula espinal o aumentos de señal que pudieran sugerir una proliferación celular anormal, comparando con las RNM basales. Los potenciales somatosensoriales evocados por

estimulación del nervio tibial que mostraron un retraso leve en la conducción 3 días después de la cirugía, se normalizaron al primer mes del trasplante²⁵³.

Todos los pacientes aceptaron bien el procedimiento y no mostraron modificaciones significativas de su estado psicológico o de su calidad de vida. La fuerza muscular (evaluada mediante la escala MRC) disminuyó durante los 6 meses previos al trasplante en todos los pacientes. Al tercer mes tras el implante de células madre se hizo evidente una tendencia hacia el enlentecimiento de la disminución lineal de fuerza muscular en 4 pacientes en los grupos musculares proximales de los miembros inferiores, mientras que en 2 pacientes se observó un aumento leve en la fuerza de los mismos grupos musculares²⁵³.

En una publicación posterior²⁵⁴ Mazzini et al. confirmaban que, tras 2 años de seguimiento, los pacientes no habían desarrollado efectos secundarios permanentes o cambios en la médula espinal por RNM sugestivos de proliferación celular anormal (figura 5). También objetivaron en esos 2 años de seguimiento un enlentecimiento de la disminución lineal de la capacidad vital forzada en 4 de los 7 pacientes tratados (figura 6). Notablemente, este efecto se correlacionaba con el nº de células infundido.

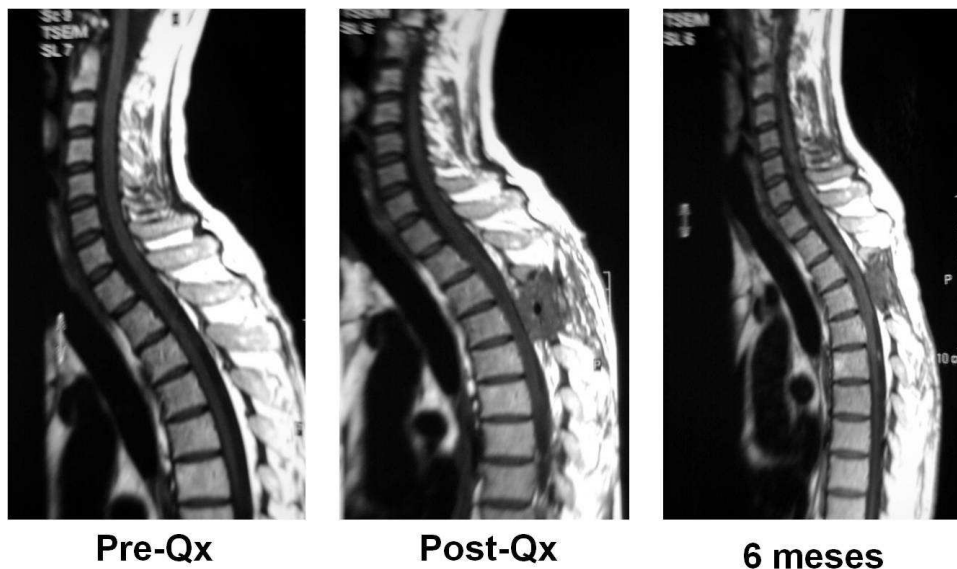


Figura 5 Evolución radiológica en el ensayo de Mazzini et al. Se observa un seroma postquirúrgico, sin daño medular ni aparición de neoformaciones (cortesía de la Dra. Mazzini).

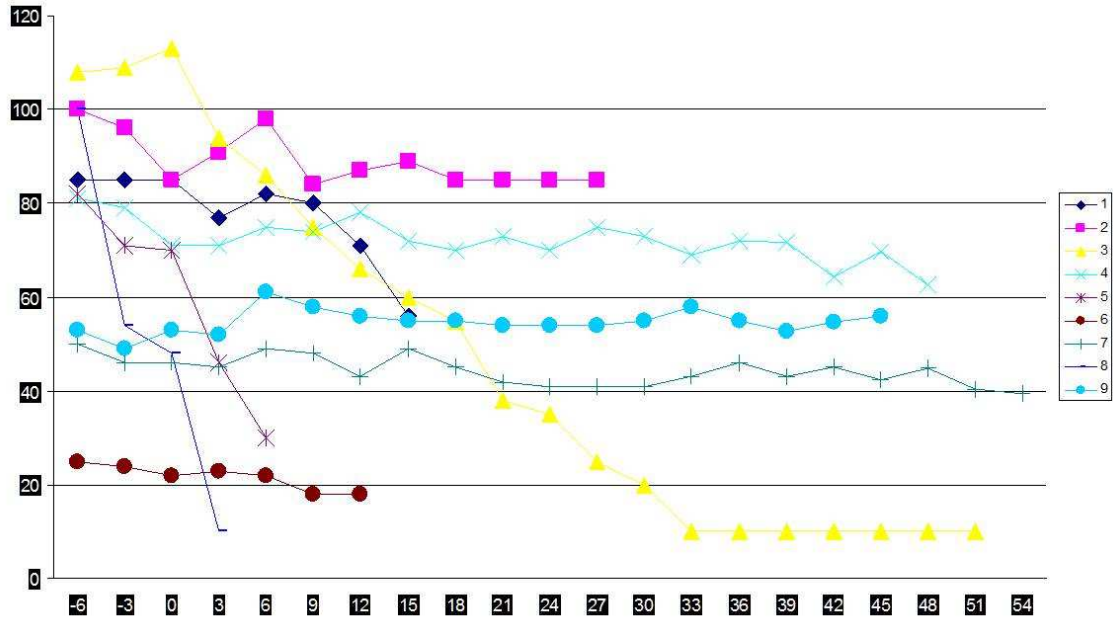


Figura 6 Evolución de la capacidad vital forzada en el ensayo de Mazzini et al. Puede apreciarse un enlentecimiento de la evolución tras la terapia celular en los pacientes 2 y 4 (cortesía de la Dra. Mazzini).

Aunque este ensayo es muy valioso y mostraba resultados preliminares esperanzadores en cuanto a la factibilidad de la terapia celular en pacientes con ELA, ha sido criticado por tener un escaso número de pacientes, un seguimiento corto y una información relativamente escasa con respecto a parámetros de seguridad y eficacia. Además, en este ensayo se empleaban células mesenquimales de médula ósea en cultivo con una tipificación incompleta, y no se aportaba ningún dato con respecto al mecanismo por el cual las células podrían ejercer su efecto beneficioso²⁵³.

Por otro lado, y como previamente hemos expuesto, se admite que en la médula ósea coexisten un grupo heterogéneo de células madre con propiedades intrínsecas diversas y también con diferentes potenciales de reparación funcional incluyendo células madre hematopoyéticas, mesenquimales, VSELs, y MAPC^{192, 211, 212, 239}. Todas estas células se pueden aislar a partir de la fracción mononuclear del

aspirado medular. De modo que al expandir estas células en cultivo y seleccionar un subgrupo determinado de ellas, se corre el riesgo de perder o disminuir el potencial neuroreparador que interesa para las enfermedades neurodegenerativas^{205, 211, 212}.

En consecuencia y con los antecedentes de nuestros estudios preclínicos previos, nos planteamos el ensayo clínico que es la base de esta memoria de investigación.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad que conduce irremediablemente a la muerte en una media de tres años tras el diagnóstico. Aunque la enfermedad no es muy frecuente, sí produce un gran impacto socio-económico ya que los pacientes no pueden cuidar de sí mismos y requieren un cuidador familiar y un equipo multidisciplinario de atención.

Actualmente no existe ningún tratamiento efectivo, lo que determina que los pacientes sufran un deterioro inexorable desde el diagnóstico, con evidencia de parálisis progresiva, habitualmente ascendente, hasta la inevitable parada respiratoria. El conocimiento de esta evolución provoca tanto en los pacientes como en el entorno familiar una gran angustia y desesperanza, con un impacto negativo en la calidad de vida y con frecuencia alteraciones severas del estado de ánimo. Son absolutamente necesarias nuevas aproximaciones terapéuticas que determinen un cambio en la historia natural de la enfermedad, y la terapia celular podría ser una alternativa.

El evento patológico subyacente es la pérdida de motoneuronas. Nuestra hipótesis de trabajo, basada en datos generados por nuestro grupo y otros investigadores en modelos animales de ELA, es que las células madre procedentes de la médula ósea pueden ejercer un efecto neurotrófico beneficioso en las motoneuronas y/o en el micromedioambiente neural, que modifique de manera positiva la evolución natural de la enfermedad. Para ello sería necesario inyectar las células madre de la médula ósea en el SNC mediante un procedimiento seguro. Como hemos comentado, existe un ensayo clínico muy preliminar realizado por la Dra Mazzini, en el que se sugiere que la infusión intraespinal a nivel T7-T9 de células madre mesenquimales es un procedimiento técnicamente factible y probablemente seguro.

Con los fundamentos previamente expuestos los objetivos de este trabajo son:

- 1) Evaluar la factibilidad y seguridad de la inyección intraespinal a nivel T3-T4 de células mononucleadas de médula ósea autóloga en pacientes con ELA.
- 2) Investigar si el neurotrofismo que se aprecia en los modelos animales también puede existir en los pacientes con ELA.

La confirmación de estos dos extremos puede abrir una nueva vía de investigación clínica en el tratamiento de la ELA.

PACIENTES Y MÉTODOS

8. Diseño del Ensayo Clínico. Aspectos generales y desarrollo inicial.

Diseñamos un ensayo clínico fase I con un único brazo para evaluar la factibilidad y seguridad de la infusión intraespinal de células mononucleadas de médula ósea autóloga (BMNC) y, eventualmente, su efecto neurotrófico en pacientes con ELA. El diseño, la metodología y los resultados de este trabajo han sido motivo de publicación²⁵⁵⁻²⁵⁷.

La seguridad fue definida primariamente como la ausencia de eventos adversos severos relacionados con el tratamiento, siguiendo las definiciones del grupo CONSORT²⁵⁸. Secundariamente, también se definió la seguridad, como una velocidad de disminución de la capacidad vital forzada y de las escalas neurológicas ALS-FRS²⁵⁹, Norris²⁶⁰ y MRC²⁶¹, no significativamente superior a la que los pacientes tenían antes de la intervención.

Para conseguir los objetivos planteados se planteó inicialmente la inclusión de 10 pacientes en el ensayo. El ensayo dio comienzo en junio de 2007 y finalizó en octubre de 2009 y estaba abierto a pacientes con ELA de toda España. Se realizó la divulgación de los criterios de inclusión y exclusión mediante los medios de comunicación disponibles de las asociaciones científicas, profesionales y de las asociaciones de pacientes.

Se evaluaron 122 historias clínicas de pacientes con ELA enviadas desde toda España. Sin embargo tan solo 32 pacientes cumplían los criterios de inclusión y pudieron ser preseleccionados. Tras este primer cribado, se programó una visita inicial en el Hospital en la que se llevó a cabo un estricto proceso de selección que incluía una evaluación médica, neurológica, respiratoria y neurofisiológica completa, según los criterios especificados en el ensayo²⁵⁵⁻²⁵⁷. Además, se realizó una evaluación psicológica para asegurar que los pacientes comprendían plenamente la naturaleza experimental del ensayo y los riesgos asociados con el procedimiento, así como para evaluar su estabilidad psicológica.

Finalmente 13 pacientes cumplieron con todos los requisitos y, tras la firma del consentimiento informado, fueron incluidos inicialmente en el ensayo. Como estaba programado, a todos estos pacientes se les realizó una evaluación trimestral, durante 6 meses, para monitorizar la velocidad espontánea e individualizada de progresión de la enfermedad (ver tabla 3). Durante ese tiempo dos pacientes hubieron de ser excluidos porque dejaron de cumplir alguno de los criterios de inclusión. A los 6 meses de seguimiento sólo quedaban 11 pacientes que seguían cumpliendo los criterios de inclusión (y ninguno de los de exclusión), y a todos ellos se les realizó el trasplante intra-espinal de células mononucleadas de médula ósea autóloga. Estos 11 pacientes conforman el grupo de estudio del ensayo clínico.

Como más adelante se expone con detalle, para la infusión celular era necesario hacer una doble laminectomía, y se escogió el nivel de las vértebras torácicas 3 y 4 (T3 y T4), con la intención de asegurar la estabilidad de la columna vertebral²⁵⁶. En la elección también se tuvo en consideración el hecho de que los músculos intercostales inervados por esos segmentos medulares son los que tienen una función inspiratoria-espiratoria más equilibrada²⁶² y, por tanto, son potencialmente los más importantes de cara a evitar el fallo respiratorio, último evento en la mayoría de los pacientes con ELA.

Tras la infusión, todos los pacientes fueron evaluados trimestralmente durante 1 año. Además, y para asegurar un registro exhaustivo de los eventos adversos, se realizaron entrevistas telefónicas semanalmente durante tres meses y, después, mensualmente hasta finalizar el año de seguimiento previsto (ver apartado de evaluaciones más abajo, y tabla 3). Los eventos adversos fueron graduados según la Terminología común para eventos adversos v3 del grupo CTCAE²⁶³.

El ensayo clínico fue aprobado por los Comités de ensayos clínicos del Hospital universitario Virgen de la Arrixaca y del Hospital Universitario Morales Meseguer. También recibió la aprobación de la Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. AAI-Pharma se encargó de la monitorización externa del ensayo, que fue registrado en www.clinicaltrials.gov (identificador NCT00855400) y en la European Clinical Trials Database (número EudraCT 2006-003096-12).

La financiación del ensayo fue posible merced a la obtención de convocatorias competitivas del Instituto Carlos III (FIS EC07/90762), la Dirección general de terapias avanzadas y trasplantes del Ministerio de Sanidad (TRA-137), la Red de terapia celular del Instituto Carlos III (Tercel; RD06/0010/0023), DIGESIC-MEC BFU2008-00588, Ingenio 2010 MEC-Consolider CSD2007-00023, beca GVA Prometeo 2009/028 y por la Fundación Diógenes.

9. Criterios de selección²⁵⁵⁻²⁵⁷

9.1. Criterios de inclusión

- Diagnóstico definido de acuerdo con los criterios establecidos por la World Federation of Neurology^{13, 14}.
- Duración de la enfermedad comprendida entre 6 y 36 meses.
- Inicio medular de la enfermedad.
- Edad comprendida entre los 20 y los 65 años.
- Capacidad vital forzada $\geq 50\%$.
- Porcentaje del tiempo total de sueño con desaturaciones de oxígeno por debajo del 90% inferior o igual al 2% ($T90 \leq 2\%$)
- Paciente que ofrezca garantías suficientes de adhesión al protocolo.

9.2. Criterios de exclusión

- Enfermedad neurológica o psiquiátrica concomitante.
- Necesidad de nutrición parenteral o enteral.
- Enfermedad sistémica concomitante.
- Tratamiento con corticoides, inmunoglobulinas o inmunosupresores en los

últimos 12 meses.

- Inclusión en otros ensayos clínicos.
- Embarazo.
- Incapacidad de comprender el consentimiento informado.

10. Variables de valoración

10.1. Variable principal

Definimos el número de eventos adversos severos relacionados con el tratamiento como variable principal del estudio. No deberá darse ninguno para que el procedimiento que ensayamos sea considerado seguro.

10.2. Variables secundarias

10.2.1. Clínicas

- Número de eventos adversos no severos relacionados con el tratamiento.

10.2.2. Neurológicas

- ALS-FRS score (0-40)
- Norris score (0-100)
- MRC score (0-60)

10.2.3. Neurorradiológicas

- RNM médula espinal alterada (si/no)

10.2.4. Respiratorias

- Capacidad Vital Forzada
- Presión inspiratoria máxima (PIM)

- Presión espiratoria máxima (PEM)
- Polisomnografía: nº apneas e hipopneas.

10.2.5. Psicológicas:

- EuroQol-5D
- POMS

11. Procedimiento de obtención y trasplante de las células mononucleadas de médula ósea autólogas (BMNC)

Se siguieron los procedimientos y protocolos ya publicados, que pasamos a referir a continuación²⁵⁵⁻²⁵⁷.

11.1. Obtención de médula ósea (figura 7)

Material:

1. 1 Bolsa de transferencia de 150 cc Teruflex transfer bags (Terumo).
2. Sampling site coupler (Baxter)
3. Suero Fisiológico (Baxter)
4. 1 vial de 5 mL de Heparina 1% (Rovi)
5. Agujas de aspirado de médula ósea (Jamshidi, Cardinal Health)
6. Llave de tres pasos (Productos Medico Hospitalares)
7. Cazoleta metálica estéril.
8. 3 bolsas de Suero fisiológico 500 cc preparadas con 10 cc de Heparina 5%).
9. 6 jeringuillas de 10 mL.

10. 1 bolsa de ACD-A (Baxter)

11. 2 tubos sin anticoagulante (para recoger plasma).

Procedimiento:

1. En la campana de flujo laminar preparar 1 bolsa de transferencia de 150 cc, y marcarla como bolsa m.o.
2. Sellar el tubo de la bolsa de transferencia.
3. Colocarle un SSC y la llave de tres pasos.
4. Añadir a la bolsa de transferencia de m.o. suero fisiológico con mezcla anticoagulante:
 - a. 60 mL de Suero fisiológico
 - b. 5 mL de heparina al 1%
 - c. 5mL de ACD-A.
 - d. Mover la bolsa para que se reparta bien la mezcla por toda la superficie.
5. Dejar la campana etanolizada y con los UV encendidos con todo el material que después se utilizará dentro (SF-heparina, 4 tubos de 50cc, 16 tubos de 15cc, Histopaque-1077).
6. Trasladar la bolsa a quirófano en condiciones estériles.
7. Lavar las jeringas y agujas de extracción de m.o. en una solución de Salino-heparina (500 cc SF + 10 cc heparina 5%, quedando una solución final de 100 U/ml) que se preparará en un recipiente metálico estéril.
8. Se obtendrá un total de 60 cc. de sangre medular. Para ello se procede a puncionar el trocar de aspirado en la cortical del hueso y, tras traspasarla, acoplar una jeringa de 5-10 ml con la que se aspira la MO. Se deberá evitar obtener más de 3 ml en una sola aspiración. Para facilitar la obtención de MO, en cada lugar de

punción se cambiará la profundidad del trocar, y en cada nivel se cambiará el punto de aspiración girando el trocar sobre su eje.

- Un ayudante de quirófano recogerá las jeringas con MO y se encargará de:
 - Comunicar en voz alta el volumen aproximado de MO en cada jeringa para que sea anotado.
 - Transferir la MO de las jeringas a las bolsas de recogida con salino-heparina a través de la llave de tres pasos. Cada vez que deposite MO se agitará suavemente la bolsa para asegurar una mezcla rápida con la solución anticoagulante.
 - Lavar las jeringas con salino-heparina (recipiente metálico) y devolverlas a los operantes para su reutilización.
 - Un segundo ayudante se encargará de:
 - Ir registrando y controlando el volumen de MO que se transfiere a cada bolsa de recogida.
9. Una vez obtenido el volumen final de 60 cc., cerrar la llave de tres pasos, envolver la bolsa en un paño estéril y enviar al laboratorio para su procesamiento inmediato.
10. Recoger dos tubos de sangre periférica sin anticoagulante para obtener plasma en el laboratorio y congelarlo.

11.2. Preparación de las células mononucleadas de médula ósea (figura 7)

Material:

1. Suero Fisiológico (Baxter)
2. 2 viales de 5 mL de Heparina 1% (Rovi)
3. Jeringas de 1, 5, 10 y 20 cc (Becton Dickinson)
4. 4 tubos de 50 cc y 16 tubos de 15 cc tipo Falcon estériles (Deltalab)

5. Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich)
6. Campana de flujo laminar Bio-II-A (Telstar)
7. Tubos de hemograma con EDTA (Vacutainer, Becton Dickinson)
8. Aspirador Pipeting Aid (Gilson)
9. Pipetas de 1, 2 y 25 cc (Deltalab)
10. Centrifuga refrigerada Jouan CR3i.
11. Agujas de punción lumbar 22G.
12. 2 tapones estériles de jeringa (Disponed UIT oHG).
13. 1 sellador de tubos (Baxter)
14. Paños de campo estériles.
15. Eppendorf 1,5 cc.
16. Gasas estériles.
17. Pipetas Pasteur estériles.
18. Alcohol 70%.
19. Guantes sin polvo.

Procedimiento:

Todos estos procedimientos se realizarán en condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar clase II A.

1. Preparar una solución de lavado SF-Heparina: añadir 10000 U heparina (2 ml al 5%, 10 ml al 1%) a una botella de 500 cc de SF (20 U/ml final). Identificar como solución de lavado.
2. Preparar 16 tubos de 15 ml y añadir a cada uno 7.5 ml de Histopaque-1077.

3. Separar en 2 alícuotas, en sendos eppendorf, para realizar recuentos celulares y citometría.
4. Con la ayuda de una jeringa, dejar caer sobre la pared de cada tubo 7.5 ml de m.o. Cerrar bien.
5. Centrifugar los tubos a 400 G (1500 rpm Jouan CR3i) durante 30 min. RT.
6. Con pipeta pasteur, desechar la capa de grasa que queda en la superficie y separar las interfases de CMN a 2 tubos de 50 ml limpios.
7. Añadir SF-heparina hasta completar 45 ml.
8. Centrifugar a 733 G (2000 rpm Jouan CR3i) durante 10 min. para precipitar las células.
9. Retirar sobrenadante sin apurar mucho.
10. Repetir los pasos 7, 8 y 9.
11. Reunir los dos pellets en un mismo tubo y repetir los pasos 7, 8 y 9.
12. Tras la última centrifugación, retirar sobrenadante a tubos limpios de 50 ml y enviar muestra del sobrenadante a microbiología para cultivo.
13. Resuspender el pellet celular en 2.10 mL de SF-heparina (es importante evitar la formación de burbujas y no sacar la punta de la pipeta fuera de la suspensión).
14. Con guantes estériles, cargar las células a infundir en 2 jeringuillas de 1 mL con una aguja de punción lumbar de 25G. Cargar 1 mL por jeringa. No extraer la burbuja de aire.
15. Retirar las agujas y poner un tapón a la jeringa.
16. Envolver las jeringuillas en un paño estéril y trasladarlas inmediatamente al quirófano de neurocirugía para su implante. Mantener en todo momento las jeringuillas en agitación para que no sedimenten las células.
17. Con una pipeta de 1 mL, recoger 100 μ L y pasarlos a un eppendorf estéril.

18. Pasar 10 μL de esos 100 μL a otro eppendorf, realizar dilución 1:10 en SF y pasar la suspensión por el contador celular. El resto se utilizarán para realizar la citometría, la viabilidad con azul de tripano, un frotis, para obtener ADN y para hacer cultivos.

19. Calcular la concentración celular, CNT y viabilidad.

11.3. Citometría

1. Escribir en una hoja los tubos que se van a marcar: canal y monoclonal:

- Tubo 1: controles
- Tubo 2: CD45-FITC (Pharmingen), CD133-PE (Miltenyi), CD34- PrCP-Cy5.5(Pharmingen), CD117-APC (Pharmingen)
- Tubo 3: CD14-FITC (Becton Dickinson), CD38-PE (Becton Dickinson), CD45-PrCP-Cy5.5 (Becton Dickinson), CD34-APC (Becton Dickinson)

2. Rotular convenientemente tantos tubos como se vayan a precisar y colocarlos en fila en una gradilla.

3. La cantidad de células a dispensar en cada tubo es de 1.000.000. Para hallar el volumen de muestra a dispensar, basta con hacer la siguiente operación:

$$\text{Vol}=1000000/n^{\circ} \text{ de leucocitos por } \mu\text{L}$$

Sabiendo que la muestra a dispensar no puede sobrepasar los 200 μL . Por tanto, puede ser necesario hacer una centrifugación previa de la muestra y resuspender el pellet en un volumen adecuado de PBS.

NOTA: Todas las centrifugaciones se realizarán a 320 G y durante 3.5 min.

4. Marcar los tubos siguiendo las especificaciones de volumen/ n° células del fabricante.

5. Al finalizar el marcaje, hacer una agitación suave e incubar durante 15 min.

6. Mezclar con 1 ml de solución de lisis, en los tubos que tengan eritrocitos.
7. Incubar 10 min. justos.
8. Centrifugar.
9. Decantar con energía (excepto si el recuento celular es escaso).
10. Mezclar con 2 ml de PBS.
11. Centrifugar.
12. Decantar con energía (excepto si el recuento celular es escaso).
13. Repetir este paso una 2^a vez.
14. Resuspender en 350 µl de PBS.
15. Pasar las muestras por el citómetro, usando el CellQuest como programa de adquisición, y recogiendo 100000 eventos CD45+.
16. Analizar el archivo posteriormente con el programa Paint-a-Gate siguiendo la normativa ISHAGE, para averiguar el nº de células CD133+ viables, y el nº de CD34+ y de CD117+.

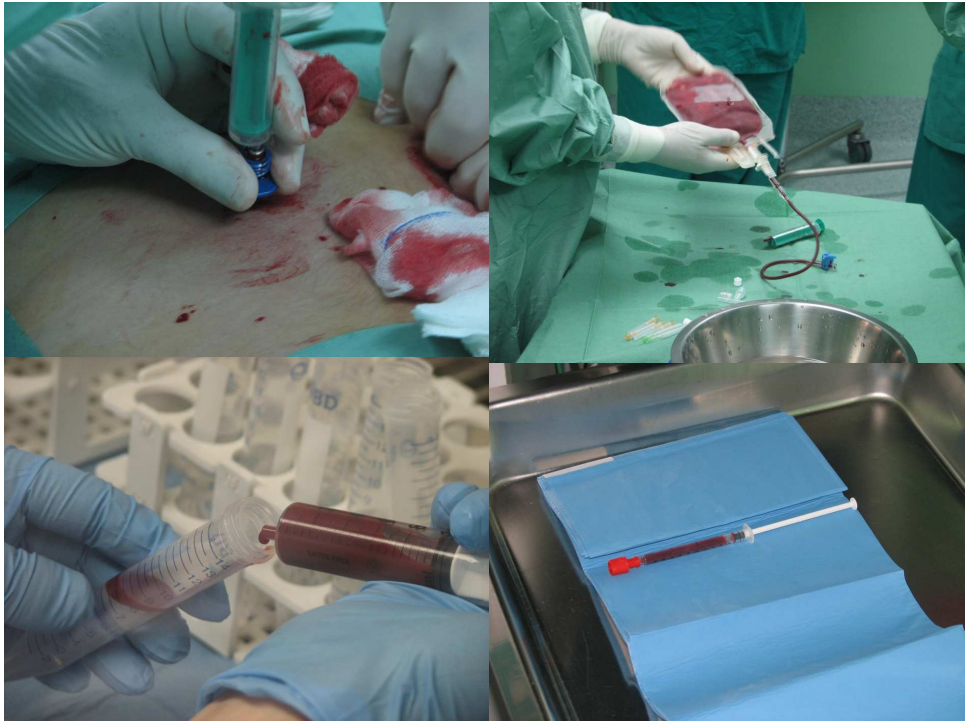


Figura 7 Extracción de la médula ósea y separación de las células mononucleadas mediante gradiente de densidad.

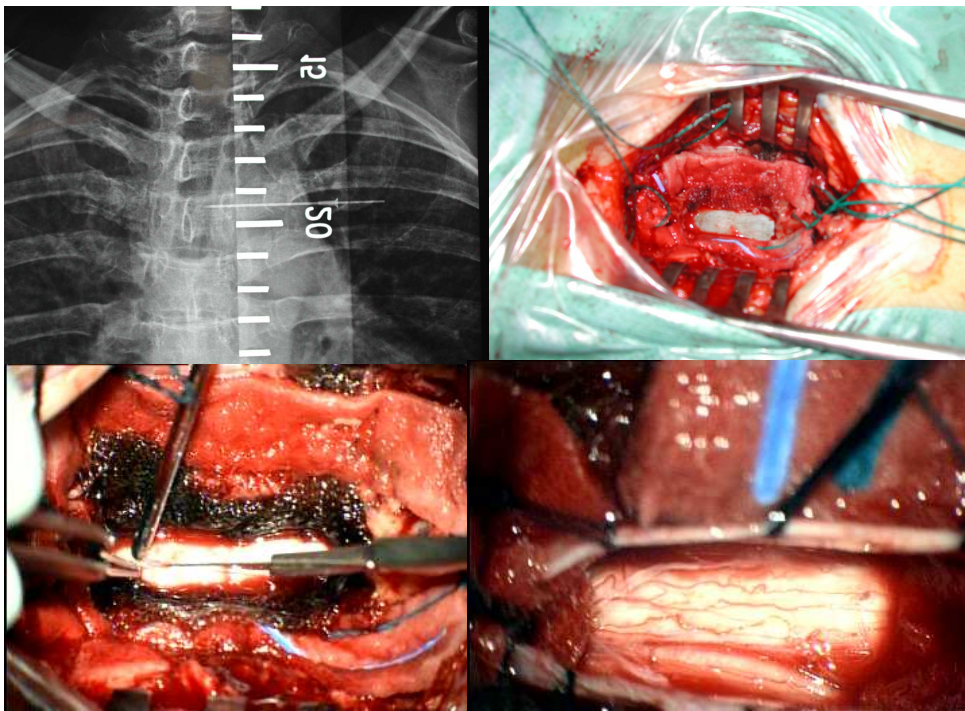


Figura 8 Laminectomía T3-T4 y exposición de la médula espinal.

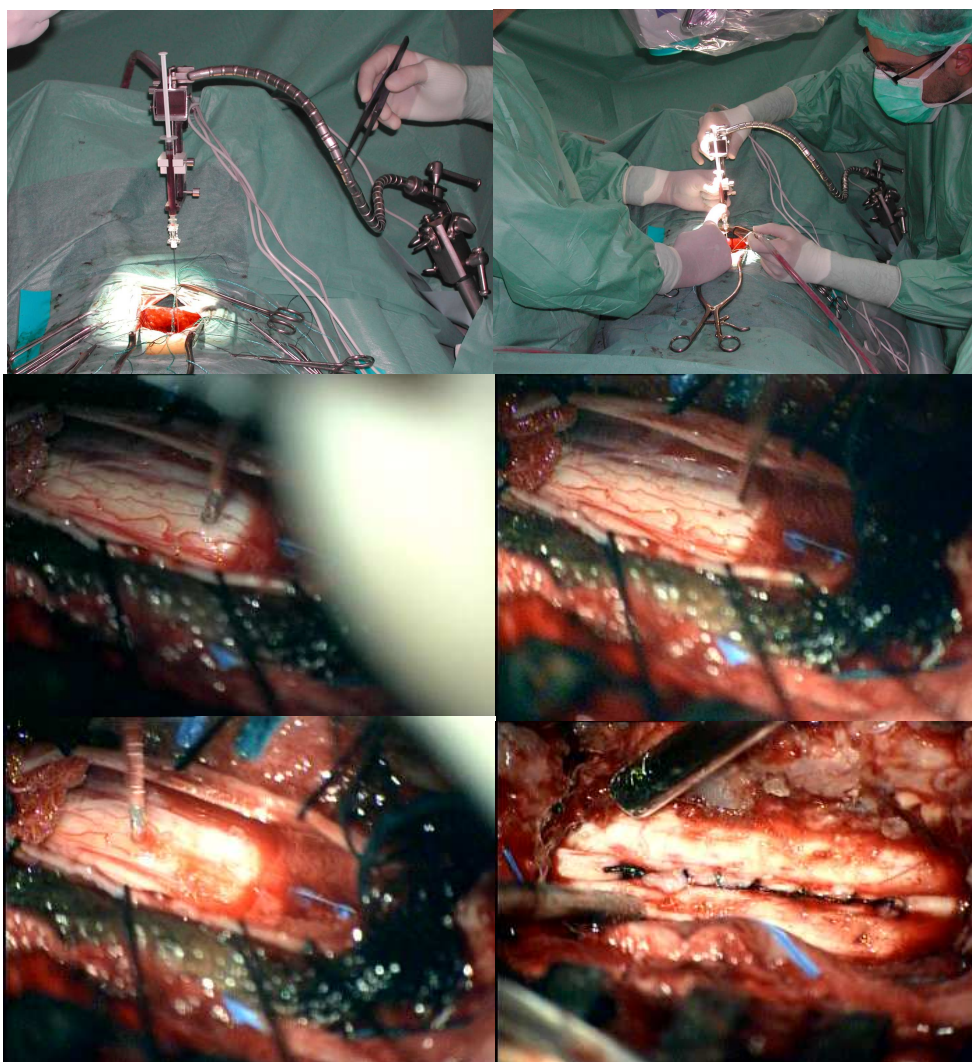


Figura 9 Infusión de las células mononucleadas mediante micro-manipulador (Medtronic) montado sobre brazo Yargasil en la zona más avascular de los cordones posteriores de la médula espinal y cierre de las meninges.

11.4. Administración de las células a los pacientes: técnica neuroquirúrgica²⁵⁵⁻

257

Previamente a la intervención se realiza una Rx de columna dorsal AP para marcar longitudinalmente en la piel del paciente con tinta indeleble (o tintura de Castellani) el espacio T3-T4 (figura 8).

En quirófano, se administra profilaxis antibiótica con 1.5g IV de Cefuroxima. En pacientes alérgicos a β -lactámicos se empleará Vancomicina 1 gr iv. Bajo anestesia general, con control de potenciales evocados y en decúbito prono sobre trineo, se lava el campo quirúrgico con solución jabonosa antiséptica y se pinta la piel con povidona yodada. A continuación se realiza una incisión cutánea de la zona marcada. Acto seguido se separa el tejido celular subcutáneo con electro-bisturí hasta descubrir las apófisis espinosas y láminas vertebrales. Se separan los músculos paravertebrales con disección roma hasta limpiar perfectamente espinosas y láminas. A continuación se realiza la laminectomía reglada de la zona. Tras descubrir la dura, y mediante técnica microquirúrgica, se incide ésta en sentido cráneo-caudal protegiendo con lentinis la médula subyacente (figura 8).

Tras exponer la médula, se procede a la infusión de las BMNC. Para ello se utiliza un brazo Leila fijado a la mesa quirúrgica al que se le acopla un retractor flexible Yargasil. Sobre el Yargasil se monta un micro-manipulador desarrollado por Medtronic que fija la jeringa de 1 mL que contiene las células, implementada con una aguja de punción lumbar de 22G. De este modo, la posición vertical de la aguja es controlada por la rueda graduada del micro-manipulador, permitiendo al neurocirujano calcular la profundidad de la inyección. Se identifican los cordones posteriores medulares en relación con las raíces nerviosas y el surco medio y se escoge la zona más avascular como punto de inyección de las células, aproximadamente a una distancia de 1-2.5 mm de la línea media. La aguja es introducida cuidadosamente en el parénquima medular hasta una profundidad de 6 mm. Tras comprobar que no ha tenido lugar ninguna hemorragia, se infunden las células contenidas en la jeringa en aproximadamente 3 minutos. Al finalizar la infusión la aguja es retirada lentamente utilizando el micro-manipulador, hasta su completa extracción de la médula. La

operación se repite con la segunda jeringa de BMNC ipsi o contralateralmente, buscando nuevamente la zona más avascular disponible (figura 9)²⁵⁵⁻²⁵⁷.

Finalmente se cierra la duramadre de forma estanca mediante sutura continua con seda, se cubre la sutura con Duragen® y se asegura el sellado con Duraseal®. Se cierra el resto de los planos en la forma habitual, dejando un drenaje Blake #10 durante 24 horas. La profilaxis antibiótica durante las 24 horas siguientes. Los pacientes se mantienen en decúbito supino durante 24-48 h, pasadas las cuales pueden levantarse y caminar. En el séptimo día postquirúrgico se retiran las grapas y se realiza una resonancia nuclear magnética previa a su alta²⁵⁵⁻²⁵⁷.

12. Evaluaciones

El esquema de evaluaciones se muestra en la tabla 3. Los pacientes fueron evaluados por los servicios de Neurología, Neumología, Radiología, Neurofisiología, Psicología y Neuropsicología de modo trimestral desde el día -180 al +360, siendo el día 0 el de la infusión de las células. Antes de la intervención los pacientes fueron evaluados por los servicios de Neurocirugía y de Anestesia. Tras la intervención, los pacientes permanecieron ingresados en el servicio de Neurocirugía durante una semana. Antes de darles el alta, se les realizó un control analítico, una resonancia nuclear magnética, potenciales evocados somato-sensoriales, una espirometría y una evaluación psicológica.

Las evaluaciones neurológicas fueron realizadas por dos neurólogos de dos hospitales distintos. La evaluación consistió en una entrevista y exploración clínicas y en la puntuación de las escalas ALS-FRS, Norris y MRC. La puntuación que se incluyó en el cuaderno de recogida de datos fue la media entre las puntuaciones de los dos neurólogos²⁵⁵⁻²⁵⁷.

La espirometría y la evaluación de la musculatura respiratoria fueron realizados con un espirómetro ZAN 100 y un pletismógrafo ZAN 500 (Waldfenster, Alemania). Se midió la capacidad vital forzada en posición sedente y se expresó como el porcentaje del valor predicho. La presión inspiratoria nasal se midió usando una boquilla especial. Los pacientes realizaron tres esfuerzos inspiratorios y espiratorios máximos desde el volumen residual hasta la capacidad pulmonar total, midiéndose la presión espiratoria máxima (PEM) y a presión inspiratoria máxima (PIM), siguiendo las recomendaciones de Polkey et al.²⁶⁴.

Los potenciales evocados somatosensoriales y la monitorización intraoperatoria de los mismos fue realizada con el Nihon-Kohden Neuropack M1 de 4 canales. Se estudiaron los potenciales evocados somatosensoriales de la extremidad inferior mediante estimulación CPI, siguiendo un protocolo estándar²⁶⁵. Se utilizó el Synergy Oxford Medelec de 2 canales para realizar la electromiografía de los músculos geniogloso/masetero, bíceps, extensor común de los dedos, primer interóseo, paravertebral dorsal, cuádriceps y tibial anterior. La polisomnografía se realizó siguiendo los criterios de la American Academy of Sleep Medicine²⁶⁶ con el Nihon-Kohden Neurofax de 20 canales.

Las resonancias magnéticas nucleares cerebrales y espinales se obtuvieron con un sistema de 1.5-T: el MRI LX.1.5T de GE Medical Systems (Milwaukee, WI). Las imágenes de la médula espinal fueron adquiridas con una antena de superficie phased-array de cuatro canales, realizando secuencias sagitales Fast Spín-Eco potenciadas en T1 y T2 y una secuencia axial de Eco de Gradiente, centrada en el área quirúrgica. En las imágenes se valoró la presencia de:

- Cambios extradurales y durales: colecciones y afectación extrínseca del contenido dural, incluyendo la compresión de la médula espinal.
- Cambios intrínsecos medulares: deformidades y cambios de señal (hiperintensidad T2 del área de infusión, edema extenso, y hemorragia aguda y crónica).

Las evaluaciones psicológicas y neuropsicológicas se realizaron con entrevistas semiestructuradas de los pacientes con y sin la familia. La evaluación

psicopatológica, prestando una especial atención a la presencia de depresión y de ansiedad, a la actitud de los pacientes y la familia hacia la enfermedad y el ensayo así como al soporte familiar, se realizó usando el test MMPI-2 para la evaluación de la personalidad, el POMS para la ansiedad y el estado de ánimo, y el Euro-QoL5D para la calidad de vida.

13. Análisis estadístico

Las variables continuas se describieron utilizando medidas de tendencia central (mediana o media) y de dispersión (desviación estándar). Las medidas categóricas fueron descritas usando tablas de frecuencias absolutas y relativas. Se comprobaron las condiciones de aplicación del análisis estadístico y se verificó la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff y la homocedasticidad mediante el test de Levene. Se utilizaron tests no paramétricos para el análisis en el caso de que no se cumplieran alguna de las condiciones. Se utilizó el test de Chi-cuadrado para la comparación entre variables categóricas, y el t de Student y test ANOVA para medidas repetidas (variable independiente: tiempo en el que los pacientes fueron evaluados) para la comparación de las variables continuas. Se siguieron los resultados positivos del ANOVA con comparaciones pareadas post-hoc usando el test de Tukey. El análisis se realizó comparando el aumento de las variables en periodos de tiempo constantes (tres y seis meses). El nivel de significación en todos los tests fue $\alpha=0.05$. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 18.0.

14. Estudio histológico e inmunohistoquímico

Se planteó a todos los pacientes la posibilidad de realizar un estudio necrópsico en caso de fallecimiento, y se les solicitó autorización para ello. Los pacientes que así lo desearon firmaron un consentimiento informado de donación al Banco de cerebros de la Región de Murcia. En caso de fallecimiento se llevó un procedimiento necrópsico reglado para estudio neurohistológico e inmunohistoquímico que se expone a continuación.

Antes de la extracción de la médula espinal se realizó una exploración in situ para detectar posibles malformaciones anatómicas. Se cortaron e identificaron en relación con el nivel de las inyecciones celulares segmentos de 1 cm de la médula espinal cervical, dorsal y lumbar, se parafinaron, se cortaron a 7 μm , se montaron en 10 series paralelas y se procesaron mediante tinción estructural (Violeta de cresilo 0.5%) e inmunohistoquímica contra marcadores específicos de células neurales (Tuj1, Chat, GFAP, Nestina, NG2), de la médula ósea (CD34, CD90, CD68, CD45, CD44, MCP1) y de neurodegeneración propios de la ELA (TDP-43, SOD1). La tinción inmunológica se realizó utilizando el procedimiento estándar biotina-avidina/HRP. Los cortes fueron incubados en PBS más Tritón X-100 al 0.1% (PBS-T) con peróxido de oxígeno al 0.9% durante 30 minutos, tras los cuales se bloqueó con albúmina bovina al 0.1% en PBS-T durante 1 hora. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con sus anticuerpos secundarios biotinilados correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras una incubación de 1 hora con el reactivo Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) la inmunotinción fue revelada con tetrahidroclorido de diaminobenzidina para obtener un color marrón claro, con sulfato de níquel (0.08%) para obtener precipitados negros o con aminoetil carbazol para obtenerlos rojos, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, los cortes fueron montados en portas, deshidratados y cubiertos con Eukitt. Los portas fueron fotografiados mediante microscopio (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Se contaron las motoneuronas presentes en el asta anterior de la médula espinal, con la morfología característica poligonal y con núcleo grande, en diez secciones de cada serie de violeta de cresilo de los segmentos T1, T2, T4, T5, T6, T8 y T9. Se mantuvo una separación de 280 μm entre secciones para asegurar que cada célula se contaba una única vez. Se obtuvieron muestras de médula espinal T1-T9 de dos varones de 66 y 68 años de edad sin historia de enfermedades neurológicas del Banco de cerebros de la Región de Murcia y se estudiaron siguiendo el mismo protocolo.

Tabla 4 Anticuerpos utilizados en las tinciones inmunohistoquímicas

Marcadores neurales:

- Anti- β III-Tubulina neuronal (Tuj1): Anticuerpo monoclonal de ratón IgG_a (COVANCE, Berkeley, CA)
- Anti-Colin Acetiltransferasa (Chat): Anticuerpo policlonal de cabra (CHEMICON International, Inc., Temecula, CA)
- Anti-Proteína ácida glial fibrilar (GFAP): Anticuerpo monoclonal de rata IgG_{2a} (CALBIOCHEM, La Jolla, CA)
- Anti- Nestina Humana: Anticuerpo monoclonal de ratón IgG₁ (CHEMICON International, Inc., Temecula, CA)
- Anti- Proteoglicano condroitin sulfato (NG2): Anticuerpo policlonal de conejo (CHEMICON International, Inc., Temecula, CA)

Marcador de membrana basal:

- Anti-Laminina: Anticuerpo policlonal de conejo (CHEMICON International, Inc., Temecula, CA)

Marcadores de células de la médula ósea:

- Anti- CD45 Humano: Anticuerpo monoclonal de ratón IgG₁ (AbD Serotec, Oxford, UK)
- Anti- CD34 Humano: Anticuerpo monoclonal de ratón IgG₁ (BD Biosciencias, NJ, USA)
- Anti- CD90 Humano: Anticuerpo monoclonal de ratón gG₁ (BD Biosciencias, NJ, USA)
- Anti- CD68 Humano: Anticuerpo monoclonal de ratón IgG_{2a} (AbD Serotec, Oxford, UK)
- Anti- CD44 Humano: Anticuerpo monoclonal de ratón IgG₁ (BD Biosciencias, NJ, USA)
- Anti- MCP1: Anticuerpo policlonal de conejo (ABCAM, Cambridge, UK)

Marcadores de neurodegeneración

- Anti-Superóxido Dismutasa 1 (SOD 1): Anticuerpo policlonal de oveja (ABCAM, Cambridge, UK)
- Anti-TDP-43: Anticuerpo monoclonal de conejo, IgG (ABCAM, Cambridge, UK)

RESULTADOS

1. Características de los pacientes

Las características de los pacientes en el momento de su inclusión en el ensayo clínico están resumidas en la Tabla 5. Se incluyeron 11 pacientes con una edad mediana de 46 años (rango 32-61). La duración mediana de la enfermedad desde el diagnóstico hasta la infusión de las BMNC fue de 21 meses (rango 11-40). La capacidad vital forzada a la entrada en el ensayo de los pacientes fue de un 105% de mediana (rango 79-121). Las puntuaciones medianas de las escalas ALS-FRS, Norris y MRC fueron de 30 (rango 24-38), 74 (rango 54-95) y 46 (rango 35-54) respectivamente. Todos los pacientes recibieron su tratamiento específico para la enfermedad habitual durante todo el ensayo. Este tratamiento incluía el Riluzol en la totalidad de los mismos, vitamina E en seis, creatina en tres, carbonato de litio en tres, baclofen en tres y tizanidina en dos. El ensayo dio comienzo en junio de 2007 y finalizó en octubre de 2009.

Tabla 5 Características de los pacientes

# Paciente	Sexo	Edad	TTI (meses)	CVF (%)	ALS-FRS	Norris	MRC	Tratamiento ELA
1	F	46	20	113	24	54	45	R, E, C, L, B, T
2	M	61	21	104	28	74	37	E,C,L
3	F	54	16	94	28	69	38	R, T
4	F	43	40	105	36	87	47	R
5	M	45	38	79	27	74	42	R, E
6	M	31	33	104	34	79	46	R, E, C, B
7	F	49	29	115	28	71	35	R
8	F	50	23	99	30	70	46	R, E
9	F	52	24	121	32	81	50	R, E, B
10	M	43	14	120	35	83	50	R, L
11	M	41	15	116	38	95	54	R
Mediana		46	21	105	30	74	46	

TTI: tiempo del diagnóstico a la infusión, CVF: Capacidad vital forzada, R: Rilutek, E: vitamina E,

C: Creatina, L: Carbonato de litio, B: Baclofen, T: Tizanidina

2. Recogida de las células mononucleadas de médula ósea y trasplante

Se infundieron una mediana de 462 x10⁶ BMNC (rango 138-602.87) que incluían una mediana de 2.77 x10⁶ células CD34+ (rango 0.55-23.39), 2.31 x10⁶ células CD117+ (rango 0.41-10.25) y 1.3 x10⁶ células CD133+ (rango 0.41-5.43). Los datos individualizados por paciente se exponen en la Tabla 6. La viabilidad celular se analizó en 9 pacientes, siendo del 80% (rango 70-95).

La infusión celular se realizó siguiendo el procedimiento previsto. No hubo complicaciones anestésicas. Sólo se registró un evento adverso relacionado con la cirugía que consistió en una reducción de los potenciales evocados somatosensoriales en un paciente al 50% durante 10 minutos, coincidiendo con la apertura de la duramadre.

Tabla 6 Número y tipo de células infundidas

# Paciente	BMNC x10 ⁶	CD34+ x10 ⁶	CD117+ x10 ⁶	CD133+ x10 ⁶
1	602,87	10,25	10,25	5,43
2	542,40	5,42	3,80	1,63
3	248,00	3,22	2,48	2,73
4	138,00	0,55	0,41	0,41
5	494,00	2,47	1,98	0,99
6	310,00	1,86	1,24	1,24
7	462,00	2,77	2,31	1,39
8	544,00	23,39	2,72	1,09
9	370,60	1,85	1,48	1,11
10	476,00	2,86	3,33	2,38
11	324,00	1,94	2,27	1,30
Mediana	462,00	2,77	2,31	1,30

BMNC: Células mononucleadas de médula ósea autóloga.

3. Eventos adversos no severos relacionados con el tratamiento

Los 11 pacientes sufrieron un total de 43 eventos adversos no severos posiblemente, probablemente o definitivamente relacionados con el tratamiento (Tabla 7). El 51% de estos eventos adversos ocurrió durante las dos primeras semanas después de la cirugía. El 26% se resolvió en los dos primeros meses, un 14% duró menos de nueve meses y solo un 9% persistían al final del año de seguimiento. Todos los eventos adversos fueron un grado ≤ 2 del CTCAE, siendo el estreñimiento el más frecuente y duradero (10 pacientes), junto con dolor en la zona de la herida quirúrgica de hasta tres meses de duración (7 pacientes) y dolor en la región intercostal de hasta dos meses de duración (5 pacientes). Los pacientes también presentaron pequeñas áreas de hipoestesia, parestesia y disestesia (7, 4 y 2 pacientes, respectivamente) de escasa relevancia clínica y localizadas fundamentalmente en los miembros inferiores. Estos síntomas neurológicos desaparecieron en 3-4 meses, excepto en dos pacientes que al final del año de seguimiento todavía presentaban una pequeña zona de hipoestesia en la planta de un pie. Tres pacientes presentaron síntomas transitorios de hipotensión intracraneal. Otros eventos adversos al menos posiblemente relacionados con el tratamiento fueron cefalea, vértigo, hiperestesia en la zona quirúrgica e insomnio.

4. Eventos adversos severos

Durante el ensayo se recogieron 6 eventos adversos severos. Ninguno de ellos se consideró relacionado con el procedimiento. El paciente 2 experimentó en el día +137 un flutter auricular con síncope asociado, que requirió un día de hospitalización y se resolvió espontáneamente. El día +378, el paciente volvió a acudir a urgencias por un nuevo flutter auricular que volvió a revertir espontáneamente. Sin embargo, al alta sufrió un embolismo pulmonar masivo que le causó la muerte.

Tabla 7 Eventos adversos no severos relacionados

Eventos adversos no severos relacionados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ESTREÑIMIENTO	2 +4 a +365	2 +1 a +365	2 +1 a +7	2 +1 a +6	1 +2 a +4	2 +1 a +5	2 +2 a +5		1 +1 a +3	1 +0 a +2	2 +1 a +6
DOLOR EN LA HERIDA					1 +2 a +6	1 +3 a +5	2 +1 a +60	1 +2 a +26	2 +1 a +52	1 +1 a +104	2 +1 a +93
HIPOESTESIA	1 +6 vemas dedos	1 +2 a +87 errático		2 / 1 +1 a +23 +24 a +365		1 +4 a +46 piernas		1 +2 a +118 piernas	1 +2 a +365 herida/pie		1 +2 a +31 pierna decha
DOLOR INTERCOSTAL	1 +5 a +11	1 +1 a +4	1 +2 a +11	2 +1 a +53		2 +4 a +27					
PARESTESIA	1 +6 a +11 labios				1 +2 a +11 piernas	1 +4 a +46 costal bajo	1 +4 a +6 piernas				
HIPOTENSIÓN INTRACRANEAL				2 +1 a +3		2 +9 a +28		2 +1 a +6			
DISESTESIA								2 +32 a +118			1 +32 a +274
CEFALEA				1 +18 a +22		2 +4					
VERTIGO										2 +1 a +5	
HIPERESTESIA EN LA ZONA QUIRURGICA										1 +2 a +43	
INSOMNIO											1 +2 a +7
				<2 semanas	<2 meses	<9 meses	1 año				

En la parte superior de cada celda se muestra el grado CTCAE, seguido de la duración en días desde el trasplante. En algunos eventos adversos se ha indicado su localización. Las celdas se han coloreado dependiendo de la duración del evento adverso.

La paciente 3 requirió ingreso hospitalario por insuficiencia respiratoria secundaria a una infección respiratoria en el día +236. Aunque el episodio pudo ser resuelto, la enfermedad continuó progresando y finalmente falleció por insuficiencia respiratoria en el día +359.

Finalmente, la paciente 8 desarrolló en el último trimestre del seguimiento una colecistitis aguda que requirió colecistectomía posteriormente.

Posteriormente y ya fuera del seguimiento del ensayo, también han fallecido los pacientes 1 y 5 los días +808 y +1058. La paciente 1 falleció por una infección por el virus de la gripe H1N1, y el 5 por infección respiratoria e insuficiencia respiratoria secundaria. Los pacientes 1, 2 y 3 donaron su médula espinal y cerebro al Banco de cerebros de la Región de Murcia.

Actualmente a fecha de 31 de marzo de 2012 siguen vivos siete de los 11 pacientes, con una mediana de supervivencia desde la infusión de 3.5 años (rango 3.3-4.3).

5. Evolución clínica

No se apreció un empeoramiento en la tasa de deterioro de las variables espirométricas (CVF $p=0.901$, PIM $p=0.85$, PEM $p=0.27$) ni de las escalas neurológicas (ALS-FRS $p=0.515$, Norris $p=0.839$, MRC $p=0.167$)²⁵⁵.

En la figura 10 queda recogida la evolución de las escalas ALS-FRS, Norris y MRC, y en la figura 11 la de la CVF, PIM y PEM de todos los pacientes. En todas las gráficas la línea negra con triángulos representa la evolución de la media de los valores de todos los pacientes en cada uno de los puntos. Mientras que esta línea muestra lo descrito estadísticamente en el párrafo anterior, la observación de la evolución de los valores en los pacientes individuales nos permite apreciar datos que pueden ser interesantes a pesar de no tener peso estadístico. Así, el bloque principal de pacientes (4, 5, 6, 7, 10) presentaba un deterioro progresivo de sus puntuaciones. Los pacientes 2, 9 y 11, sin embargo, no sufrieron deterioro en las escalas

neurológicas ni en la función respiratoria a lo largo del ensayo. La evolución antes del trasplante de los pacientes 1 y 3 era la más acelerada de la serie. Sin embargo, su devenir después del mismo fue dispar. Mientras que la paciente 3 continuó empeorando hasta fallecer como consecuencia de la enfermedad, la paciente 1 logró estabilizar su situación en las escalas neurológicas y enlentecer su deterioro respiratorio, siendo la paciente en la que sin duda el tratamiento ha cambiado el curso de su enfermedad. También es reseñable que la CVF media al final del seguimiento fue todavía del 80%.

La evolución del PIM y el PEM, indicadores indirectos de la funcionalidad de la musculatura accesoria inspiratoria y espiratoria respectivamente, fue más llamativa que la de las escalas neurológicas y la CVF. Así 6 pacientes presentaron en el seguimiento PEM superiores a la del día de la intervención y en 5 la PEM al final del seguimiento fue al menos similar a la del día +0. Lo mismo sucedió con la PIM en 6 y 3 pacientes respectivamente.

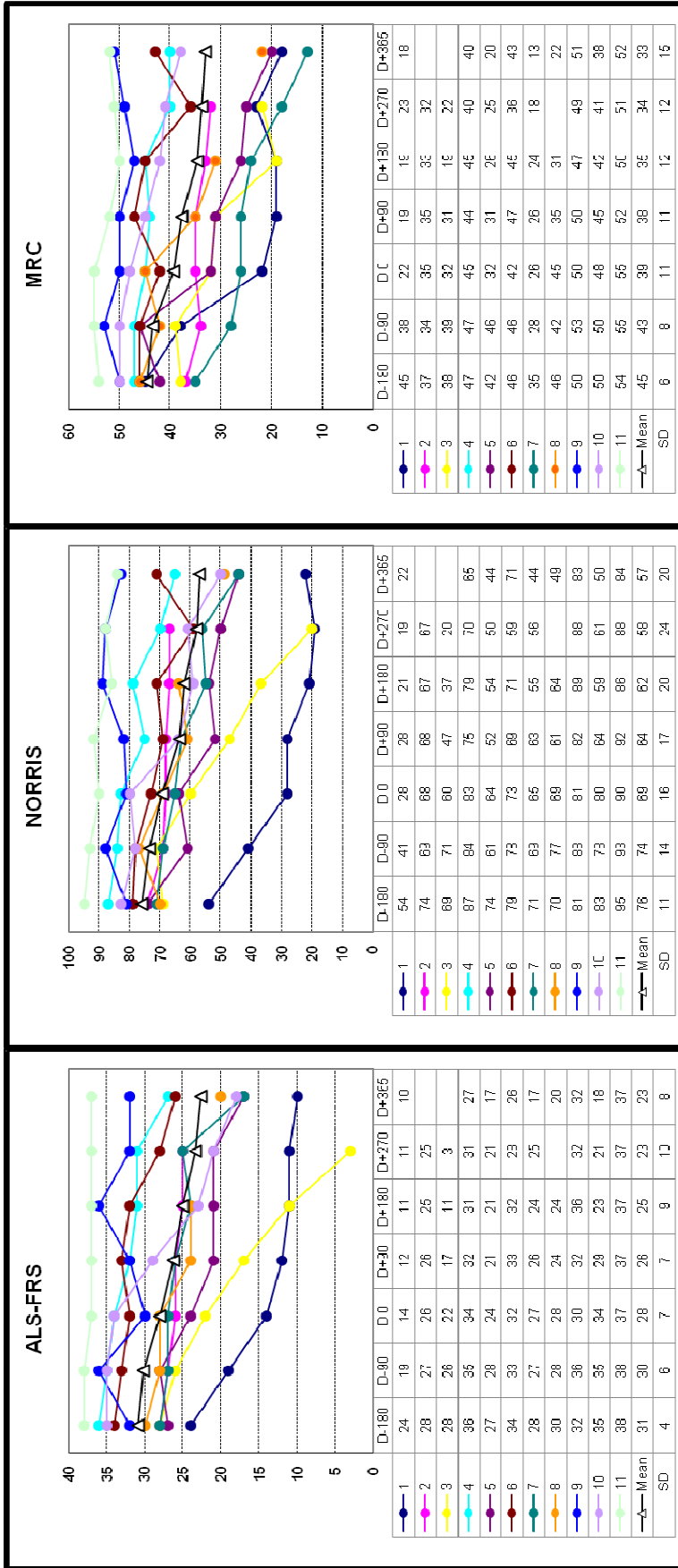


Figura 10 Evolución de las escalas neurológicas

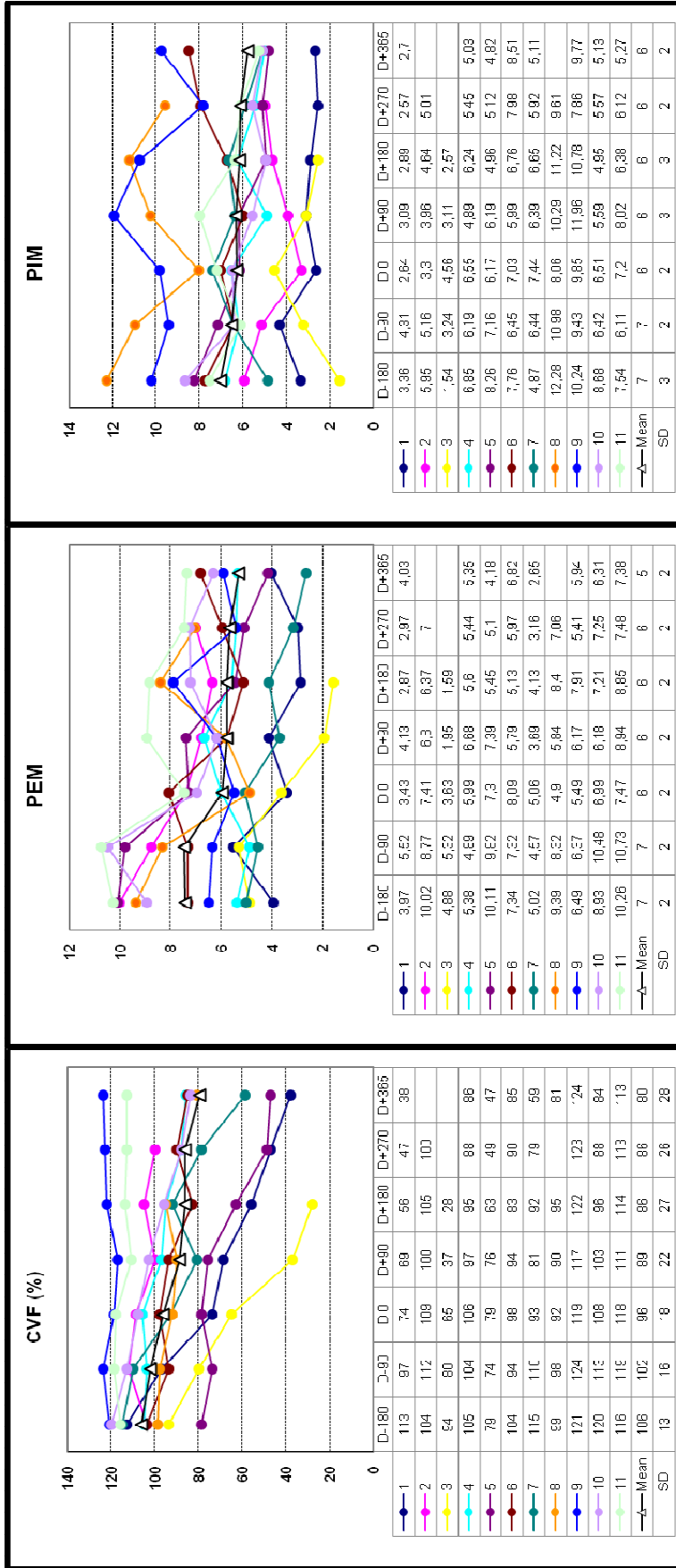


Figura 11 Evolución de las escalas respiratorias.

CVF: capacidad vital forzada, PFM: presión espiratoria máxima, PIM: presión inspiratoria máxima.

Durante el seguimiento los potenciales evocados somatosensoriales empeoraron progresivamente en ocho pacientes (descenso de amplitudes e incremento de latencias) llegando a desaparecer, produciéndose un bloqueo de cordones posteriores. No se observó ninguna correlación clínica con este hallazgo. El paciente 9, que había experimentado una reducción transitoria de sus potenciales evocados somatosensoriales durante el trasplante, mantuvo sus potenciales estables durante todo el seguimiento.

En la evolución postoperatoria se observó una caída del T90 <2% únicamente en los pacientes 8 y 10. En ninguno de ellos aumentó de modo significativo el nº de apneas. En general, disminuyó la eficiencia del sueño, haciéndose más superficial y fragmentado: disminuyeron el tiempo total sueño y las fases de sueño profundo (III/IV), y aumentaron la vigilia intrasueño y las fases de sueño superficial (I y II). Disminuyeron también el nº y duración de fases REM.

Las exploraciones neuropsicológicas mostraron que la gran mayoría de los pacientes (>80%) habían sufrido algún tipo de reacción psicológica adaptativa a lo largo de la enfermedad, aunque no cuadros depresivos francos. No se encontraron trastornos de personalidad ni un perfil característico asociado a los pacientes de ELA. El estado de ánimo de los pacientes (tensión, depresión, cólera, vigor, fatiga y confusión) medido con la escala POMS (figura 12) se mantuvo estable a lo largo del ensayo ($p=0.45$). La escala EuroQol (figura 13) demuestra una caída significativa en la calidad de vida hasta el tiempo de la infusión ($p<0.01$) que, sin embargo, permanece estable después de la misma ($p=0.649$).

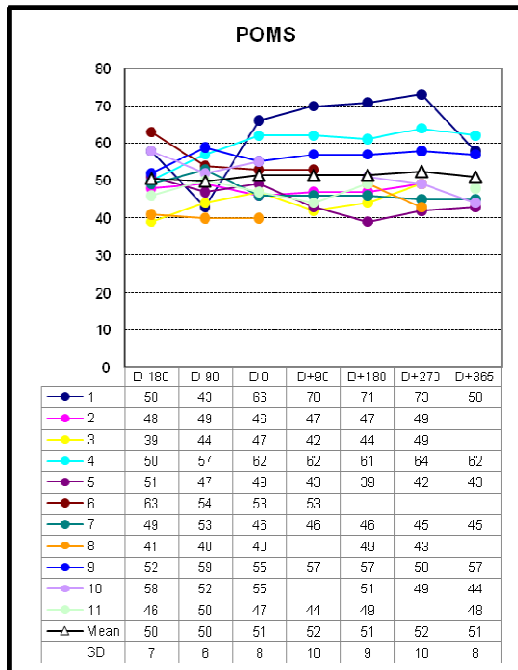


Figura 12 Evolución de la escala POMS

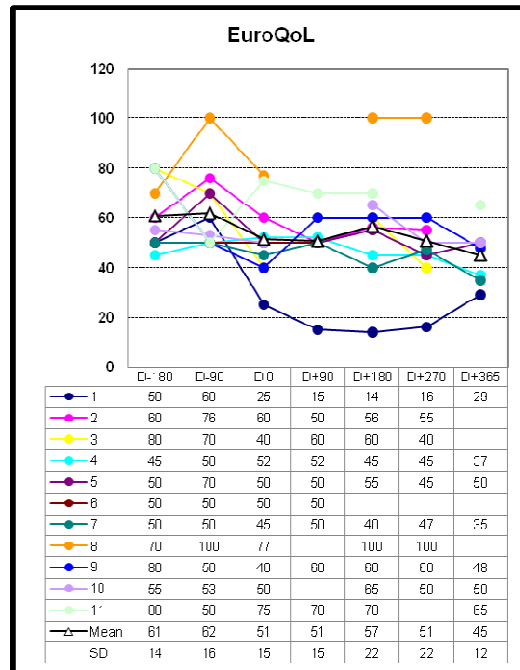


Figura 13 Evolución de la calidad de Vida

6. Evolución radiológica

Inmediatamente tras la intervención, se apreciaron colecciones extradurales-extraespinales postquirúrgicas en todos los pacientes. En los pacientes 1, 3, 5 y 10 estas colecciones ejercieron un discreto y transitorio efecto masa en la médula espinal. Se apreció una zona de hiperintensidad en T2 autolimitada sugestiva de edema intraparenquimatoso en la médula espinal en nueve pacientes. En los pacientes 3 y 6 este aumento de la señal en T2 persistió hasta el final del seguimiento. Aunque se observó algún grado de deformidad de la médula espinal en todos los pacientes tras el trasplante, solo en dos de ellos el diámetro antero-posterior llegó a ser mayor que el transversal. Los pacientes 3, 6 y 8 mostraron una hemorragia subaguda en la resonancia post-quirúrgica, cuya imagen persistió hasta el final del seguimiento, aunque sin repercusión funcional o clínica. En la figura 14 se muestra un ejemplo representativo de los hallazgos de RNM a lo largo del estudio.

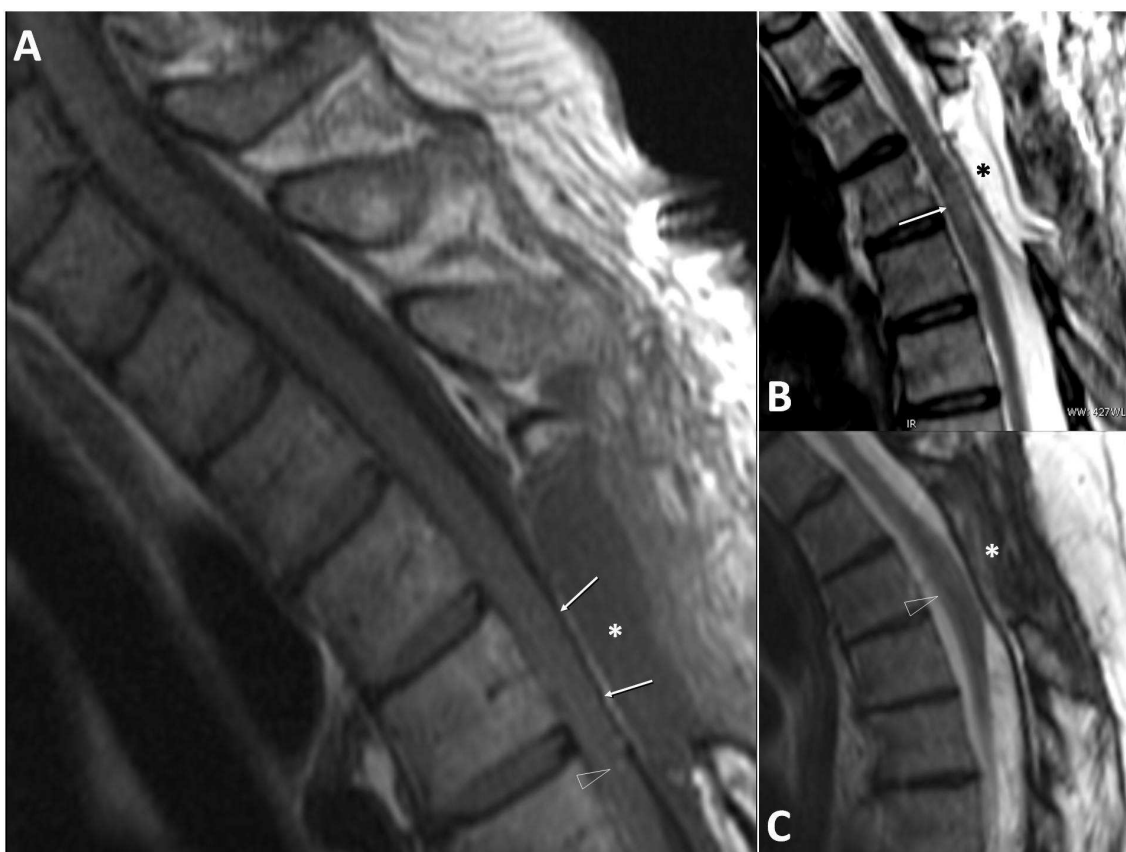


Figura 14 Resonancia nuclear magnética

- A) Secuencia spin-echo en T1 en el nivel de la laminectomía una semana tras la cirugía. Una colección líquida extradural (asterisco) ejerce un efecto masa moderado sobre la médula espinal (flechas), que también muestra algunos puntos hiperintensos (flechas) que sugieren un sangrado subagudo.
- B) Secuencia fast spin-echo en T2 en el nivel de la laminectomía una semana tras el trasplante. La colección líquida ejerce un efecto masa sobre el saco dural, sin afectar la médula espinal. Sin embargo, muestra una leve hiperintensidad en el área quirúrgica (flecha).
- C) Secuencia fast spin-echo en T2 en el nivel de la laminectomía al final del seguimiento. La colección apreciada previamente es ahora una cicatriz (asterisco). La médula espinal muestra una deformidad substancial con un diámetro antero-posterior aumentado.

7. Estudio necrópsico

El estudio necrópsico se realizó sobre cortes de médula espinal de los pacientes 1, 2 y 3.

El examen macroscópico de los segmentos infundidos de la médula espinal no mostró ningún daño o anomalía anatómica secundarios al trasplante (fig. 15 A, B). Tampoco se apreciaron tumores o neoformaciones²⁵⁵⁻²⁵⁷.

Las secciones en parafina teñidas con tinción de Nissl mostraron una acumulación local de células esferoides y basofílicas en el trayecto de la aguja (fig. 15 C,D). También se apreció una acumulación de vasos en la sustancia gris cercana al injerto, en la base de las astas anteriores (fig. 15 D).

El número medio de motoneuronas espinales en el asta anterior de los segmentos torácicos aumentó a medida que nos acercábamos a los segmentos infundidos: de 0.9 ± 0.3 motoneuronas/sección en los segmentos superiores (T1) e inferiores (T8-9) a 4.2 ± 0.8 motoneuronas/sección en los niveles medulares infundidos (T4-T5) (fig. 16). Las diferencias entre segmentos fueron significativas (T1 a T2 $p < 0.01$; T2 a T4-T5 $p < 0.01$; T4-T5 a T8-T9 $p < 0.01$), pero no entre los tres pacientes analizados. La médula espinal control tenía una media de 14.4 ± 1.2 motoneuronas/sección en las astas anteriores de T4-T6. Se identificaron células que expresaban marcadores hematopoyéticos como CD45, CD90 y CD68 en la sustancia gris medular (fig. 15 E-K). Sin embargo, únicamente en los segmentos infundidos se observaron células pequeñas y esféricas rodeando las motoneuronas, formando un nido celular (fig. 15 I, R). De modo consistente con nuestros datos preclínicos²⁰⁶, estos nidos celulares no expresaban ningún marcador neural. Además eran CD45 y CD68 negativos (fig. 15 J, K) y CD90 positivos (fig. 15 I, R). También analizamos la presencia de signos degenerativos en las motoneuronas. No se detectó inmunorreacción contra SOD1, confirmando la naturaleza esporádica de la ELA de nuestros pacientes^{143, 267}. Se contaron un total de 41 motoneuronas CHAT positivas en los segmentos caudales al nivel infundido. Ninguna de ellas tenía nidos celulares, 36

mostraban colapso citoplasmático y depósitos intracelulares de ubiquitina TDP-43 positivos (fig. 15 L, M), mientras que solo cinco no presentaban signos degenerativos. Al aproximarnos a los segmentos infundidos las motoneuronas medulares mostraban menos signos degenerativos y depósitos intracitoplasmáticos (fig. 15 O, P). De modo llamativo, las motoneuronas rodeadas por nidos celulares CD90 positivos no tenían depósitos de ubiquitina (76 de 88 motoneuronas [86.4%] contadas en T4-T5 en las tres necropsias) (fig. 15 R, Q), mientras que 11 de 12 motoneuronas cercanas [91.6%] que no tenían nidos celulares mostraban depósitos globulosos intracitoplasmáticos (fig. 15 Q, tabla 8)²⁵⁵⁻²⁵⁷.

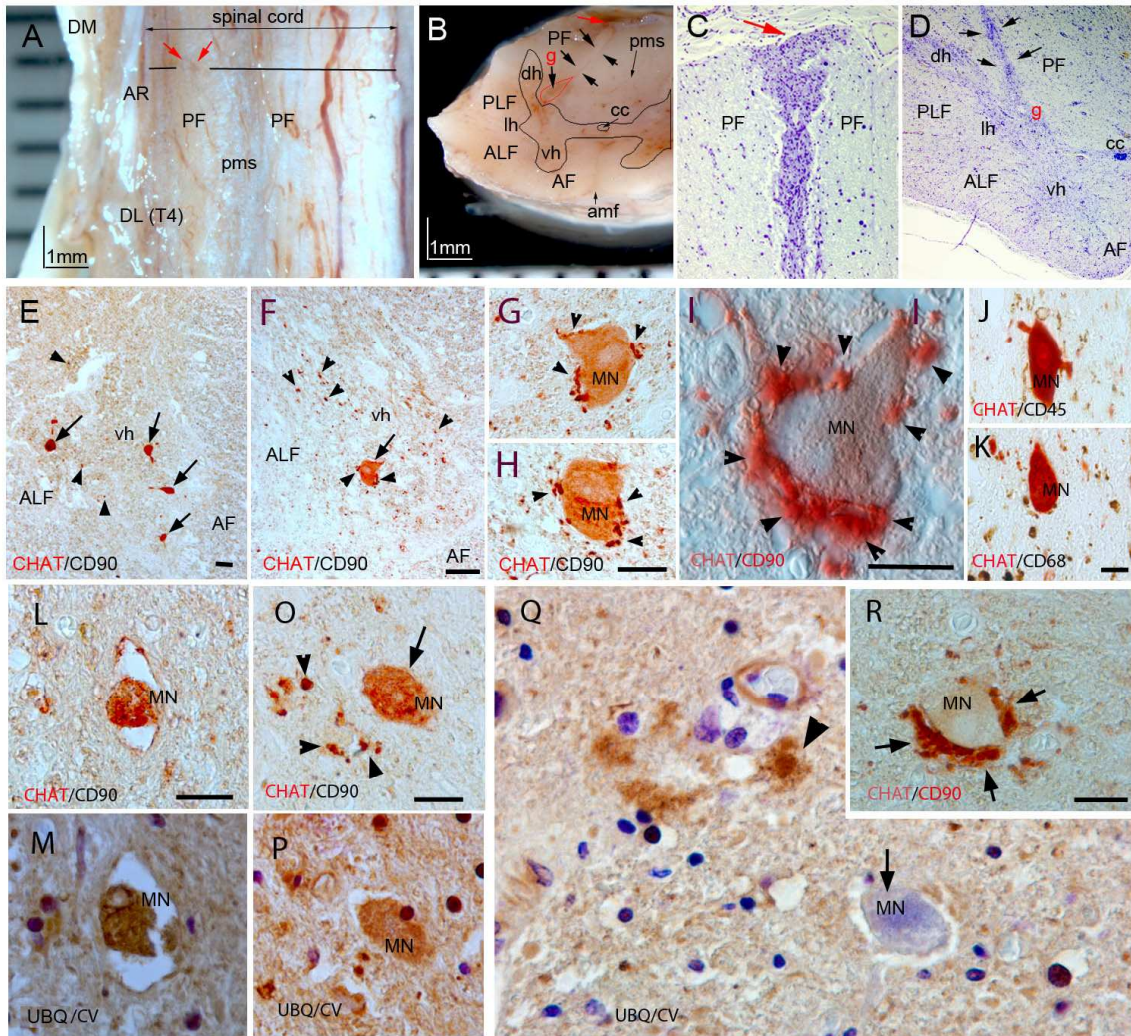


Figura 15 Hallazgos anatomo-patológicos en la médula espinal

(A) Imagen macroscópica mostrando una vista dorsal de la médula espinal torácica. Las flechas rojas marcan la cicatriz pial residual, donde la aguja fue introducida en el cordón posterior izquierdo. (B) Sección transversal de T4 mostrando el punto de entrada de la aguja (flecha roja), trayectoria (flechas negras) y el área de infusión de las células (rodeada por una línea roja).

Microfotografías de secciones del segmento espinal T4 parafinado con tinción de Nissl mostrando: (C) células basofílicas relleno del tracto de la aguja desde la región subpial (flecha roja); (D) sustancia gris de la médula espinal en el nivel de la infusión de las células. Las flechas negras muestran la trayectoria a través del cordón posterior hacia el área de la infusión (g) en la sustancia gris central.

Tinción inmunohistoquímica doble con colinacetiltransferasa (CHAT, rojo) y CD90 (negro) mostrando que (E) en los niveles torácicos rostrales a los segmentos infundidos (T1-T2) se detectan algunas neuronas CHAT positivas (flechas), pero apenas se observan células CD90 positivas (puntas de flecha). (F) En las secciones del nivel T4 se observan motoneuronas CHAT positivas (flecha) y células CD90 positivas (puntas de flecha). (G y H) Microfotografía de alto aumento mostrando motoneuronas CHAT positivas (MN) rodeadas por nidos células CD90 positivas (puntas de flecha) en T4 y en T5 (I). Las poblaciones CD45 (J) y CD68 (K) positivas no forman nidos rodeando las motoneuronas CHAT positivas.

Secciones medulares contiguas procesadas mediante inmunohistoquímica contra CHAT/CD90 y TDP-43 mostrando (L y M) una motoneurona degenerativa con colapso citoplasmático y vacuolización (L) en el segmento T1 con inclusiones TDP-43 positivas (M). (O y P) En segmentos más cercanos –T2- se detectan algunas células CD90 positivas cerca de las motoneuronas (O, flecha) y alguna inmunorreacción granular TDP-43 positiva está presente en el citoplasma y el núcleo de las motoneuronas (P). Finalmente (Q y R), en los segmentos infundidos (T3-T5) se observan nidos de células CD90 positivas (R, flechas) en motoneuronas que no tienen ninguna inmunoreactividad contra el TDP-43 (Q, flecha), mientras que las motoneuronas que no tienen nidos celulares muestran inclusiones globulosas citoplasmáticas de TDP-43 (Q, punta de flecha).

Escalas: 1 mm (A, B), 100 μ m (E, F), 50 μ m (G-R). Abreviaturas: AF: cordón anterior; amf: fisura media anterior; ALF: cordón anterolateral; AR: raíz anterior; cc: canal central; DL: ligamento dentado; dh: asta dorsal; g: área infundida; lh: asta lateral; PF: cordón posterior; PLF: cordón posterolateral; pms: surco medio posterior; vh: asta ventral.

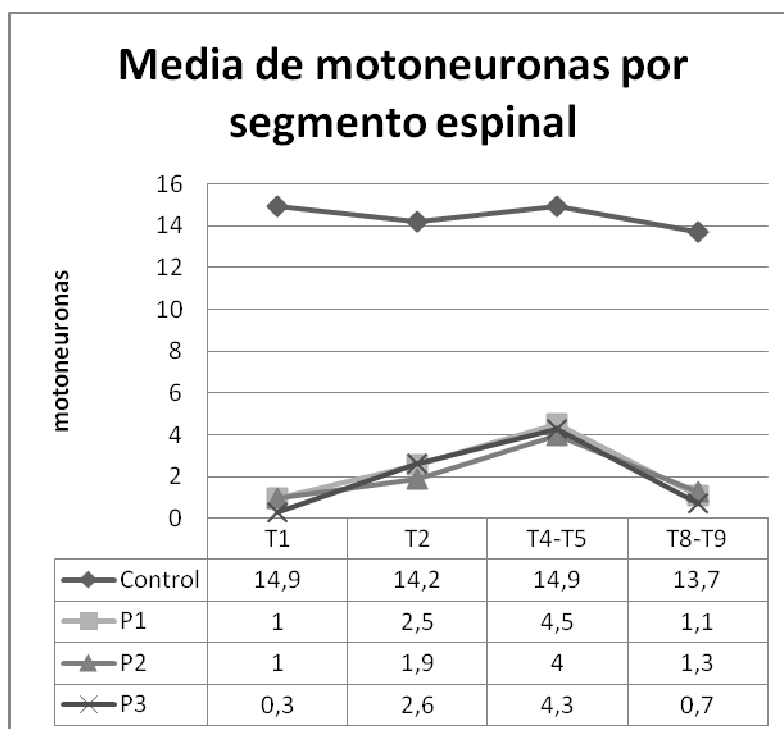


Figura 16 Media de motoneuronas por segmento espinal.

	CD90+ y UBQ- T4-T5/T8-9	CD90- y UBQ+ T4-T5/T8-9	CD90+ y UBQ+ T4-T5/T8-9	CD90- y UBQ- T4-T5/T8-9
Paciente 1	23/0	5/11	0/0	0/1
Paciente 2	19/0	3/12	0/0	1/2
Paciente 3	34/0	3/13	0/0	0/2
MNs Totales	76/0	11/36	0/0	1/5

Tabla 8 Recuento de motoneuronas con nidos de células CD90+ y depósitos de ubiquitinina (UBQ) en los segmentos T4-T5 y T8-T9.

DISCUSIÓN

En las últimas dos décadas se han probado casi 50 compuestos farmacológicos para el tratamiento de los pacientes con ELA^{165, 268}. Sin embargo únicamente el Riluzol ha demostrado tener alguna actividad terapéutica, y esta limitada a un aumento de la supervivencia de 2-3 meses²⁶⁹. El tratamiento de esta enfermedad necesita, por tanto, de nuevas aproximaciones terapéuticas. Los estudios preclínicos muestran que el tratamiento con células madre puede producir un efecto beneficioso con capacidad para modificar el curso natural de la enfermedad a través de mecanismos multifactoriales, muchos de ellos relacionados con sus efectos tróficos²⁷⁰. Este efecto concuerda, además, con la importancia en la patogenia y desarrollo de la enfermedad de la estabilidad del soporte ofrecido por células gliales a las motoneuronas^{149, 150, 152, 153, 156, 271}, así como del correcto aporte de factores tróficos^{144, 145, 147, 148}. El neurotrofismo puede por tanto ser beneficioso directamente sobre la supervivencia de las motoneuronas, abortando el mecanismo de muerte apoptótica, como indirectamente sobre las células del micromedioambiente, disminuyendo las señales de inflamación, la activación inmunopatológica o la liberación de moléculas disreguladoras de actividades celulares clave. Nuestro grupo ensayó esta hipótesis en un modelo animal de degeneración de motoneurona y demostró que la infusión intraespinal de células de médula ósea produce un efecto neurotrófico mediado por GDNF que no sólo mejora la supervivencia de las motoneuronas en los ratones infundidos respecto a los controles, sino que también mejora su estado funcional²⁰⁶. Estos prometedores hallazgos, concordantes con los realizados por otros grupos con fuentes celulares similares y otras diferentes²⁰¹, no habían sido corroborados en pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, diseñamos un ensayo clínico fase I para explorar la factibilidad y seguridad de la administración intraespinal a nivel T4-T5 de células mononucleadas autólogas de médula ósea en pacientes con ELA, como paso previo necesario para poder comprobar su eficacia. Además, nos propusimos comprobar el potencial efecto neurotrófico de estas células en el hipotético caso de que tuviéramos la oportunidad de hacer estudios necrópsicos²⁵⁵⁻²⁵⁷.

3. Factibilidad y seguridad de la inyección intraespinal a nivel T4-T5 de células mononucleadas de médula ósea autóloga

En base a los datos reflejados en esta memoria y recientemente publicados, el objetivo principal del estudio, la seguridad del procedimiento, puede considerarse como demostrado, puesto que ninguno de los pacientes experimentó ningún evento adverso severo relacionado con el procedimiento²⁵⁵. De hecho, todos los eventos adversos no severos al menos posiblemente relacionados con el procedimiento fueron como máximo grado 2 de la escala CTCAE v.3 y desaparecieron en su mayoría en un plazo inferior a dos meses. Al final del estudio únicamente persistía estreñimiento en dos pacientes y una zona de hipoestesia en parte de la planta del pie en otros dos pacientes, uno de los cuales también presentaba una pequeña zona de hipoestesia en la zona de la herida. Además, la intervención no aceleró el ritmo de progresión de la enfermedad, medido con las escalas ALS-FRS, Norris y MRC. Como era previsible tras una inyección intraespinal, se objetivaron alteraciones radiológicas medulares visibles en la resonancia nuclear magnética, pero la mayoría de ellas fueron transitorias y, en cualquier caso, no tuvieron ninguna repercusión clínica.

En el momento del diseño del ensayo, únicamente Mazzini et al.^{253, 254} habían publicado una experiencia clínica preliminar, infundiendo en la médula espinal de un grupo limitado de siete pacientes con ELA células mesenquimales de médula ósea autólogas obtenidas tras cultivo in vitro. Los resultados, descritos extensamente en la introducción de esta memoria, sugerían que el procedimiento era seguro. A diferencia de nuestro estudio, la infusión se realizaba a un nivel inferior (T7-T9).

En años posteriores y mientras nuestro ensayo ya estaba en marcha, se han publicado otros estudios en los que se ha ensayado la infusión intraparenquimatosa de células madre de diferentes orígenes, que se citan a continuación:

- Deda et al.²⁷² infundieron a 13 pacientes células mononucleadas de médula ósea autóloga separadas mediante gradiente de Ficoll y congeladas con dimetilsulfóxido al 10% en la parte anterior de la médula espinal a nivel cervical, previa laminectomía de C1-C2. Infundieron 0.1 mL de células mediante una aguja de 21 G en múltiples inyecciones en la médula espinal.

Después cubrieron la médula espinal con Gelfoam, en el que inyectaron 3 mL de células (al menos 10^6 células). Al cerrar la duramadre inyectaron 1.5 mL de células (aproximadamente 5×10^6 células) en el espacio subaracnoideo y, finalmente, otros 1.5 mL intravenosamente.

- Martínez et al.^{273, 274} infundieron $2.5-7.5 \times 10^5$ células CD133+ procedentes de aféresis autólogas de sangre periférica movilizada con G-CSF en la corteza motora de 10 pacientes y compararon su evolución con la de otros 10 pacientes que no entraron en el ensayo a pesar de cumplir los criterios de inclusión. Desgraciadamente, los resultados de la comparación no son valorables debido al mayor tiempo de evolución de la enfermedad en los pacientes del grupo control (30.1 vs 14.3 meses). Los mismos autores han publicado recientemente²⁷³ la prolongación del brazo experimental del estudio a 67 pacientes.
- Mazzini et al.²⁷⁵ realizaron un segundo ensayo clínico fase I inyectando células madre mesenquimales autólogas en la médula espinal tras laminectomía en T4-T6 (el ensayo previo fue en T7-T9) en 10 pacientes. Recientemente han publicado el seguimiento a largo plazo de los 19 pacientes combinados de los dos ensayos²⁷⁶. El rango de seguimiento de los pacientes es de 24 a 105 meses.
- Finalmente, Glass et al.²⁷⁷ acaban de publicar un ensayo en fase I en el que infunden 10^6 de células madre neurales derivadas la médula espinal de un feto de 8 semanas en la médula espinal de 12 pacientes, repartidas en 10 inyecciones de 10^5 células cada una, tras laminectomía de T11-T12. Los pacientes recibieron inmunosupresión con metilprednisolona y prednisona y dos dosis de basiliximab, seguidos de tacrolimus y micofenolato mofetil durante toda la duración del estudio (6-18 meses).

Adicionalmente, otros autores han intentado aprovechar la capacidad de las células madre de la médula ósea de generar células gliales²⁷⁸:

- Appel et al.²⁷⁹, siguiendo la experiencia creada en el contexto de la leucodistrofia metacromática^{280, 281}, realizaron un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica de hermano HLA idéntico a seis pacientes con ELA. El acondicionamiento incluía una dosis única de 450 cGy de irradiación corporal total en el día -6 y 30 mg/m² de fludarabina y 10 mg/kg de ATG los días -5 a -2. La profilaxis de enfermedad injerto contra huésped se realizó con tacrolimus y metotrexate. Los seis pacientes alcanzaron quimera mixta en el día +30 que llegó a ser del 100% en cuatro pacientes tras la disminución y suspensión de los inmunosupresores. Un paciente adicional llegó a tener quimera completa hematológica tras recibir infusión de linfocitos del donante.
- Cashman et al.²⁸² movilizaron a sangre periférica los progenitores hematopoyéticos de ocho pacientes de ELA con filgastrim (300-600 µg/kg/d x 5-6 días) hasta recolectar mediante aféresis un mínimo de 2x10⁶ células CD34+, que eran infundidas intravenosamente el día siguiente a la recogida.
- Nefussy et al.²⁸³ realizaron el único ensayo aleatorizado y doble ciego. Reclutaron 39 pacientes con ELA, a 19 de los cuales les administraron filgastrim 5 µg/kg/d sc durante 4 días consecutivos cada tres meses, hasta completar cuatro ciclos. Los 20 pacientes restantes recibieron suero fisiológico en la misma pauta. Desgraciadamente 13 pacientes (6 con filgastrim, 7 con placebo) revocaron el consentimiento para continuar el estudio, siete pacientes (4 con filgastrim, 3 con placebo) precisaron traqueostomía y quedaron por eso fuera del ensayo, y 2 pacientes del brazo de filgastrim fallecieron. Por tanto sólo 17 pacientes finalizaron el estudio (7 con filgastrim, 10 con placebo), obligando a los investigadores a comparar únicamente las valoraciones realizadas en los seis primeros meses cuando la tasa de pérdida de pacientes era solo del 28.2%.

No es posible realizar comparaciones valorables entre los diferentes estudios expuestos y nuestro trabajo, dada la diversidad tanto cuantitativa como cualitativa de las fuentes celulares utilizadas, las diferencias en las técnicas y sitios de infusión

celular, el escaso número de pacientes y los diferentes diseños empleados. No obstante, todos los ensayos citados presentan datos de seguridad del procedimiento similares a los que hemos obtenido con nuestro estudio, dando solidez a nuestros resultados. La evidencia acumulada indica, por tanto, que la terapia celular en ELA es factible y, lo que es más importante, segura. Sin embargo, su eficacia nunca ha sido realmente testada: se trata de series de pacientes cortas y como se ha comentado sin grupos aleatorizados de pacientes controles. El único ensayo aleatorizado²⁸³ no es correctamente analizable por la alta tasa de pérdida de pacientes que presenta. A pesar de ello, ofrece datos esperanzadores como el hecho de observar una caída de la escala ALS-FRS-R de 6.56 puntos en el brazo placebo y solo de 4.66 en el brazo con filgastrim, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Otro ensayo con grupo control²⁷⁴, aunque no aleatorizado, ofrece también mejores supervivencias en los pacientes que recibieron las células CD133+ (66 vs 19 meses). Sin embargo, este resultado puede estar influido por el hecho de que los pacientes del grupo control tenían un tiempo de evolución de la enfermedad mayor que los del grupo experimental, lo que es reconocido como un factor pronóstico adverso en esta enfermedad. El ensayo con el mejor grupo control es el de Appel et al.²⁷⁹ y no encuentra diferencias en la evolución de los pacientes trasplantados respecto a los controles, pero en este caso se realizó un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y el número de pacientes tratados fue únicamente de seis. Probablemente la técnica más agresiva es la empleada por Deda et al.²⁷². Sin embargo, también es la que ofrece resultados más esperanzadores: nueve de los trece pacientes presentaban mejoría en la escala bulbar y Norris, así como electroneurológica, un año después de la intervención.

La evolución de nuestros pacientes concuerda con el marco general creado por el resto de ensayos clínicos: con pacientes que claramente parecen haberse beneficiado de la intervención, una mayoría en la que la enfermedad se mantiene estable en su curso, y otra minoría con un curso agresivo que no se ve modificado por la intervención²⁵⁵.

4. Efecto neurotrófico de las células mononucleadas de médula ósea autóloga

El diseño del presente ensayo estaba basado fundamentalmente en los resultados preclínicos generados por nuestro grupo que demostraban que, en un modelo animal de ELA, las células de médula ósea inyectadas en la médula espinal, migraban al asta anterior de la misma, formaban nidos celulares alrededor de las motoneuronas y producían GDNF²⁰⁶. Nuestra hipótesis, por tanto, era que los mecanismos neurotróficos mediados por las células mononucleadas de médula ósea modificarían positivamente el microambiente de las motoneuronas y, de este modo, favorecerían su supervivencia. Y, de hecho, las muestras procedentes de las autopsias mostraron rasgos histológicos bien definidos en cuanto a número y distribución de las células y de las motoneuronas, así como ausencia de signos degenerativos en las motoneuronas.

En las astas anteriores de los niveles medulares trasplantados (T4-T5) el recuento de motoneuronas fue mayor que en otros niveles torácicos más rostrales y más caudales. Únicamente en los niveles infiltrados se observó un número significativo de células CD90+ esféricas, pequeñas y basofílicas, adyacentes a -o alrededor de- las motoneuronas. La morfología y disposición de esas células era idéntica a la observada en nuestro modelo animal, en el que habíamos demostrado un efecto neurotrófico de dichas células sobre las motoneuronas mediado por GDNF²⁰⁶. Además, las motoneuronas rodeadas por células CD90+ no tenían depósitos de ubiquitina ni mostraban signos morfológicos de neurodegeneración, sugiriendo que el mecanismo neurotrófico mediado por las células trasplantadas observado en nuestro modelo animal se estaba reproduciendo en nuestros pacientes.

Todo esto sugiere que las células mononucleadas autólogas de médula ósea son capaces de injertar en las astas anteriores de la médula espinal de pacientes con ELA, sobrevivir durante un tiempo prolongado formando nidos perineuronales y que, muy probablemente, protegen a las motoneuronas de la neurodegeneración²⁵⁵.

De los ensayos clínicos anteriormente citados, solo los de Cashman et al.²⁸² y el de Appel et al.²⁷⁹ realizaron estudios necrópsicos. Ninguno de los dos infundió directamente células madre en la médula espinal de los pacientes. El primero estaba

basado en la movilización de progenitores de médula ósea con G-CSF, y únicamente encontró los cambios degenerativos propios de la ELA. El segundo, sin embargo, sí encontró infiltración de la médula espinal por células macrofágicas-monocíticas y dendríticas en los lugares de patología de motoneurona. Esta infiltración era mayor que la observada en las médulas de pacientes no tratados con trasplante alogénico y se correspondía con un aumento del DNA procedente del donante en dichas zonas. Probablemente la justificación de esta diferencia observada con respecto al ensayo de Cashman et al. tenga que ver con la rotura de la barrera hematoencefálica producida por la irradiación corporal total realizada en el acondicionamiento del trasplante alogénico. Ninguno de estos autores observaron el fenómeno descrito por nosotros de formación de nidos neuroprotectores de células madre CD90+, siendo, por tanto, la primera vez que se describe en humanos²⁵⁵.

Nuestros hallazgos demuestran por primera vez en pacientes con ELA un mecanismo de acción neurotrófico de la terapia con células madre autólogas procedentes de médula ósea y abren una nueva vía de investigación en la terapia con células de las enfermedades neurodegenerativas.

Nuestro grupo continúa actualmente en esta línea de investigación traslacional y ya está en marcha un estudio de eficacia aleatorizado con un grupo control. Nuestro propósito es intentar trasladar los hallazgos de la ciencia básica a la clínica, volviendo de nuevo al laboratorio para resolver las nuevas incógnitas que surjan en los ensayos clínicos, así como otras preguntas aún no resueltas de esta novedosa aproximación terapéutica basada en “curar con células”.

CONCLUSIONES

- **En relación con la factibilidad y seguridad de la inyección intraespinal de células mononucleadas de médula ósea autóloga.**

Nuestros resultados demuestran la ausencia de eventos adversos severos relacionados con el procedimiento. Se apreciaron eventos de intensidad leve o moderada, de duración transitoria. Concluimos, por tanto, que nuestra técnica de inyección intraespinal de células mononucleadas autólogas de médula ósea en pacientes con ELA, es factible y segura.

- **En relación al efecto neurotrófico que se aprecia en los modelos animales y su potencial existencia en los pacientes con ELA.**

La similitud de los hallazgos histológicos encontrados en los pacientes estudiados y los de nuestro modelo animal, el incremento significativo del número de motoneuronas en los segmentos medulares trasplantados, y la ausencia de signos degenerativos en las motoneuronas rodeadas por nidos celulares, indican con un alto grado de certeza que las células mononucleares autólogas de médula ósea inyectadas en la médula espinal de pacientes con ELA ejercen un efecto neurotrófico similar al observado en estudios preclínicos.

Estos datos abren nuevas vías de investigación en la terapia celular de las enfermedades neurodegenerativas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Charcot J-M. De la sclérose latérale amyotrophique. *Prog Med (Paris)* 1874;2:325-455.
2. Rowland LP. How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Arch Neurol* 2001;58(3):512-515.
3. Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve* 2000;23(3):336-343.
4. Hurwitz LJ. L'Hopital de la Salpetriere, Paris. *Br Med J* 1962;1(5286):1196-1197.
5. Cruveilhier J. Sur le paralysie musculaire, progressive, atrophique. *Bull Acad Med* 1853;18:490-583.
6. Charcot J-M. Sclérose des cordons latéraux se la moelle épinière chez une femme hystérique atteinte de contracure permanente des quatre membres. *Bull Memoires Soc Med Hop Par* 1865;24-35.
7. Charcot J-M., Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et de faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Arch Physiol Norm Pathol* 1869;1:354-357.
8. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2001;344(22):1688-1700.
9. Mitsumoto H, Chad DA, Pioro EP. Clinical features, signs and symptoms . In: F.A.Davis, editor. *Amyotrophic lateral sclerosis*. Philadelphia: Oxford University Press; 1998:47-64.
10. Shaw PJ, Strong M. Clinical principles in the diagnosis of motor neuron disorder. *Motor Neuron Disorders*. Boston: Elsevier Health Sciences; 2003.
11. Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: a population-based study. *Arch Neurol* 2000;57(1):109-113.
12. Davenport RJ, Swingler RJ, Chancellor AM, Warlow CP. Avoiding false positive diagnoses of motor neuron disease: lessons from the Scottish Motor Neuron Disease Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60(2):147-151.
13. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* 1994;124 Suppl:96-107.
14. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1(5):293-299.
15. de CM, Dengler R, Eisen A et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol* 2008;119(3):497-503.

16. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:3.
17. Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci* 2001;191(1-2):3-9.
18. Prieto I, García T, Martín MT, Cortés JA. Guía para la atención de esclerosis lateral amiotrófica (ela) en España. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2009 <http://www.msc.es/profesionales/prestacionesSanitarias/publicaciones/docs/esclerosisLA.pdf>.
19. Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* 2007;68(13):1002-1007.
20. Chancellor AM, Slattery JM, Fraser H, Swingler RJ, Holloway SM, Warlow CP. The prognosis of adult-onset motor neuron disease: a prospective study based on the Scottish Motor Neuron Disease Register. *J Neurol* 1993;240(6):339-346.
21. Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Incidence and prevalence of ALS in Ireland, 1995-1997: a population-based study. *Neurology* 1999;52(3):504-509.
22. Johnston CA, Stanton BR, Turner MR et al. Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: a population based study of inner city London. *J Neurol* 2006;253(12):1642-1643.
23. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81(4):385-390.
24. Haverkamp LJ, Appel V, Appel SH. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 1995;118 (Pt 3):707-719.
25. Gouveia LO, de CM. Young-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a distinct nosological entity? *Amyotroph Lateral Scler* 2007;8(6):323-327.
26. Zaldivar T, Gutierrez J, Lara G, Carbonara M, Logroscino G, Hardiman O. Reduced frequency of ALS in an ethnically mixed population: a population-based mortality study. *Neurology* 2009;72(19):1640-1645.
27. Chio A, Calvo A, Dossena M, Ghiglione P, Mutani R, Mora G. ALS in Italian professional soccer players: the risk is still present and could be soccer-specific. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10(4):205-209.
28. Kasarskis EJ, Lindquist JH, Coffman CJ et al. Clinical aspects of ALS in Gulf War veterans. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10(1):35-41.
29. Horner RD, Grambow SC, Coffman CJ et al. Amyotrophic lateral sclerosis among 1991 Gulf War veterans: evidence for a time-limited outbreak. *Neuroepidemiology* 2008;31(1):28-32.
30. Armon C. Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology* 2009;73(20):1693-1698.

31. Alonso A, Logroscino G, Hernan MA. Smoking and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81(11):1249-1252.
32. Sutedja NA, Veldink JH, Fischer K et al. Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10(5-6):302-309.
33. Beghi E, Millul A, Micheli A, Vitelli E, Logroscino G. Incidence of ALS in Lombardy, Italy. *Neurology* 2007;68(2):141-145.
34. Forbes RB, Colville S, Swingler RJ. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS/MND) in people aged 80 or over. *Age Ageing* 2004;33(2):131-134.
35. Andersen PM. Genetic Aspects of Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neuron Disease. In: Shaw PJ, Strong M.J., editors. *Motor Neuron Disorders*. Philadelphia: Butterworth Heinemann; 2003:207-208.
36. Mulder DW, Kurland LT, Offord KP, Beard CM. Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1986;36(4):511-517.
37. Gros-Louis F, Gaspar C, Rouleau GA. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762(11-12):956-972.
38. Li TM, Alberman E, Swash M. Comparison of sporadic and familial disease amongst 580 cases of motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51(6):778-784.
39. Veltema AN, Roos RA, Bruyn GW. Autosomal dominant adult amyotrophic lateral sclerosis. A six generation Dutch family. *J Neurol Sci* 1990;97(1):93-115.
40. Deng HX, Chen W, Hong ST et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 2011;477(7363):211-215.
41. Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 2011;7(11):603-615.
42. Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362(6415):59-62.
43. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2011;377(9769):942-955.
44. Belez-Meireles A, Al-Chalabi A. Genetic studies of amyotrophic lateral sclerosis: controversies and perspectives. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10(1):1-14.
45. Hardiman O, van den Berg LH, Kiernan MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2011;7(11):639-649.
46. Gordon PH. Amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs* 2011;25(1):1-15.

47. Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, Kramer JH, Olney RK, Miller B. Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology* 2003;60(7):1094-1097.
48. Olney RK, Murphy J, Forshew D et al. The effects of executive and behavioral dysfunction on the course of ALS. *Neurology* 2005;65(11):1774-1777.
49. McCullagh S, Moore M, Gawel M, Feinstein A. Pathological laughing and crying in amyotrophic lateral sclerosis: an association with prefrontal cognitive dysfunction. *J Neurol Sci* 1999;169(1-2):43-48.
50. Wicks P, Abrahams S, Masi D, Hejda-Forde S, Leigh PN, Goldstein LH. Prevalence of depression in a 12-month consecutive sample of patients with ALS. *Eur J Neurol* 2007;14(9):993-1001.
51. Averill AJ, Kasarskis EJ, Segerstrom SC. Psychological health in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2007;8(4):243-254.
52. Hardiman O. Management of respiratory symptoms in ALS. *J Neurol* 2011;258(3):359-365.
53. Okuda B, Yamamoto T, Yamasaki M, Maya K, Imai T. Motor neuron disease with slow eye movements and vertical gaze palsy. *Acta Neurol Scand* 1992;85(1):71-76.
54. Kobayashi M, Ikeda K, Kinoshita M, Iwasaki Y. Amyotrophic lateral sclerosis with supranuclear ophthalmoplegia and rigidity. *Neurol Res* 1999;21(7):661-664.
55. Silani V, Messina S, Poletti B et al. The diagnosis of Amyotrophic lateral sclerosis in 2010. *Arch Ital Biol* 2011;149(1):5-27.
56. Chio A. ISIS Survey: an international study on the diagnostic process and its implications in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 1999;246 Suppl 3:III1-III5.
57. Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1998;44(4):696-699.
58. Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 2004;62(10):1758-1765.
59. Mitsumoto H, Santella RM, Liu X et al. Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2008;9(3):177-183.
60. Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, Mantle D. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* 1995;38(4):691-695.
61. Shibata N, Nagai R, Uchida K et al. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* 2001;917(1):97-104.
62. Fitzmaurice PS, Shaw IC, Kleiner HE et al. Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1996;19(6):797-798.

63. Chang Y, Kong Q, Shan X et al. Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS One* 2008;3(8):e2849.
64. Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* 2010;48(5):629-641.
65. Duan W, Li X, Shi J, Guo Y, Li Z, Li C. Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell. *Neuroscience* 2010;169(4):1621-1629.
66. Subramaniam JR, Lyons WE, Liu J et al. Mutant SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading. *Nat Neurosci* 2002;5(4):301-307.
67. Harraz MM, Marden JJ, Zhou W et al. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* 2008;118(2):659-670.
68. Wu DC, Re DB, Nagai M, Ischiropoulos H, Przedborski S. The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(32):12132-12137.
69. Rao SD, Weiss JH. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci* 2004;27(1):17-23.
70. Duffy LM, Chapman AL, Shaw PJ, Grierson AJ. Review: The role of mitochondria in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37(4):336-352.
71. Wood JD, Beaujeux TP, Shaw PJ. Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003;29(6):529-545.
72. Kanekura K, Suzuki H, Aiso S, Matsuoka M. ER stress and unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol* 2009;39(2):81-89.
73. Blackburn D, Sargsyan S, Monk PN, Shaw PJ. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* 2009;57(12):1251-1264.
74. Sargsyan SA, Monk PN, Shaw PJ. Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 2005;51(4):241-253.
75. Benatar M. Lost in translation: treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiol Dis* 2007;26(1):1-13.
76. Orrell RW, Lane RJ, Ross M. A systematic review of antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler* 2008;9(4):195-211.
77. Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR et al. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 1995;14(6):1105-1116.

78. Vande VC, Miller TM, Cashman NR, Cleveland DW. Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(10):4022-4027.
79. Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem* 2002;80(4):616-625.
80. Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD et al. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 2002;277(33):29626-29633.
81. Damiano M, Starkov AA, Petri S et al. Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem* 2006;96(5):1349-1361.
82. Grosskreutz J, Van Den Bosch L, Keller BU. Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium* 2010;47(2):165-174.
83. Sathasivam S, Grierson AJ, Shaw PJ. Characterization of the caspase cascade in a cell culture model of SOD1-related familial amyotrophic lateral sclerosis: expression, activation and therapeutic effects of inhibition. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005;31(5):467-485.
84. Sasaki S, Iwata M. Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66(1):10-16.
85. Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW et al. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2002;125(Pt 7):1522-1533.
86. De Vos KJ, Chapman AL, Tennant ME et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet* 2007;16(22):2720-2728.
87. De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CC. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 2008;31:151-173.
88. Van DP, Dewil M, Robberecht W, Van Den Bosch L. Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2005;2(3-4):147-159.
89. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003;34(4-5):325-337.
90. Williams TL, Day NC, Ince PG, Kamboj RK, Shaw PJ. Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1997;42(2):200-207.
91. Ince P, Stout N, Shaw P et al. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993;19(4):291-299.
92. Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 1995;4(2):209-216.

93. Rothstein JD, Van KM, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1995;38(1):73-84.
94. Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 1992;326(22):1464-1468.
95. Fray AE, Ince PG, Banner SJ et al. The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 1998;10(8):2481-2489.
96. Foran E, Trotti D. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(7):1587-1602.
97. Vucic S, Nicholson GA, Kiernan MC. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2008;131(Pt 6):1540-1550.
98. Vucic S, Kiernan MC. Novel threshold tracking techniques suggest that cortical hyperexcitability is an early feature of motor neuron disease. *Brain* 2006;129(Pt 9):2436-2446.
99. Kwak S, Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H. AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology* 2010;30(2):182-188.
100. Mitchell J, Paul P, Chen HJ et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(16):7556-7561.
101. Meehan CF, Moldovan M, Marklund SL, Graffmo KS, Nielsen JB, Hultborn H. Intrinsic properties of lumbar motor neurones in the adult G127insTGGG superoxide dismutase-1 mutant mouse in vivo: evidence for increased persistent inward currents. *Acta Physiol (Oxf)* 2010;200(4):361-376.
102. Boston-Howes W, Gibb SL, Williams EO, Pasinelli P, Brown RH, Jr., Trotti D. Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2. *J Biol Chem* 2006;281(20):14076-14084.
103. Milanese M, Zappettini S, Onofri F et al. Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2011;116(6):1028-1042.
104. Sunico CR, Dominguez G, Garcia-Verdugo JM, Osta R, Montero F, Moreno-Lopez B. Reduction in the motoneuron inhibitory/excitatory synaptic ratio in an early-symptomatic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol* 2011;21(1):1-15.
105. Van DP, Bogaert E, Dewil M et al. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(37):14825-14830.
106. Ince PG, Lowe J, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24(2):104-117.

107. Ince PG, Tomkins J, Slade JY, Thatcher NM, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis associated with genetic abnormalities in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase: molecular pathology of five new cases, and comparison with previous reports and 73 sporadic cases of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57(10):895-904.
108. Piao YS, Wakabayashi K, Kakita A et al. Neuropathology with clinical correlations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000. *Brain Pathol* 2003;13(1):10-22.
109. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314(5796):130-133.
110. Sobue G, Hashizume Y, Yasuda T et al. Phosphorylated high molecular weight neurofilament protein in lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases involving ventral horn cells. *Acta Neuropathol* 1990;79(4):402-408.
111. Rakhit R, Robertson J, Vande VC et al. An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nat Med* 2007;13(6):754-759.
112. Bosco DA, Morfini G, Karabacak NM et al. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci* 2010;13(11):1396-1403.
113. Groen EJ, van Es MA, van Vught PW et al. FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis in the Netherlands. *Arch Neurol* 2010;67(2):224-230.
114. Hewitt C, Kirby J, Highley JR et al. Novel FUS/TLS mutations and pathology in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2010;67(4):455-461.
115. Ackerley S, Grierson AJ, Brownlee J et al. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *J Cell Biol* 2000;150(1):165-176.
116. Ackerley S, Thornhill P, Grierson AJ et al. Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *J Cell Biol* 2003;161(3):489-495.
117. Yang Y, Hentati A, Deng HX et al. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2001;29(2):160-165.
118. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 2004;75(5):822-831.
119. Maruyama H, Morino H, Ito H et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010;465(7295):223-226.
120. Cox LE, Ferraiuolo L, Goodall EF et al. Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One* 2010;5(3):e9872.

121. Parkinson N, Ince PG, Smith MO et al. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 2006;67(6):1074-1077.
122. Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 2010;68(5):857-864.
123. Ritson GP, Custer SK, Freibaum BD et al. TDP-43 mediates degeneration in a novel *Drosophila* model of disease caused by mutations in VCP/p97. *J Neurosci* 2010;30(22):7729-7739.
124. Chow CY, Landers JE, Bergren SK et al. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet* 2009;84(1):85-88.
125. Kieran D, Hafezparast M, Bohnert S et al. A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J Cell Biol* 2005;169(4):561-567.
126. Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 1999;2(1):50-56.
127. Bilsland LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L, Schiavo G. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(47):20523-20528.
128. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998;393(6686):702-705.
129. Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG et al. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 1994;3(10):1757-1761.
130. Gros-Louis F, Lariviere R, Gowing G et al. A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2004;279(44):45951-45956.
131. Henkel JS, Engelhardt JJ, Siklos L et al. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 2004;55(2):221-235.
132. Troost D, van den Oord JJ, Vianney de Jong JM. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1990;16(5):401-410.
133. Troost D, van den Oord JJ, de Jong JM, Swaab DF. Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol* 1989;8(6):289-294.
134. Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 1992;140(3):691-707.
135. Kuhle J, Lindberg RL, Regeniter A et al. Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 2009;16(6):771-774.

136. Mantovani S, Garbelli S, Pasini A et al. Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process. *J Neuroimmunol* 2009;210(1-2):73-79.
137. Sta M, Sylva-Steenland RM, Casula M et al. Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: evidence of complement activation. *Neurobiol Dis* 2011;42(3):211-220.
138. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002;110(10):1389-1398.
139. Yamagishi S, Koyama Y, Katayama T et al. An in vitro model for Lewy body-like hyaline inclusion/astrocytic hyaline inclusion: induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 mutation. *PLoS One* 2007;2(10):e1030.
140. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 2004;165(3):347-356.
141. Atkin JD, Farg MA, Walker AK, McLean C, Tomas D, Horne MK. Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2008;30(3):400-407.
142. Matus S, Nassif M, Glimcher LH, Hetz C. XBP-1 deficiency in the nervous system reveals a homeostatic switch to activate autophagy. *Autophagy* 2009;5(8):1226-1228.
143. Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2010;9(10):995-1007.
144. Henriques A, Pitzer C, Schneider A. Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: where do we stand? *Front Neurosci* 2010;4:32.
145. Anand P, Parrett A, Martin J et al. Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease. *Nat Med* 1995;1(2):168-172.
146. Elliott JL, Snider WD. Motor neuron growth factors. *Neurology* 1996;47(4 Suppl 2):S47-S53.
147. Oppenheim RW. Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron* 1996;17(2):195-197.
148. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001;28(2):131-138.
149. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003;302(5642):113-117.
150. Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006;312(5778):1389-1392.

151. Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 2000;20(2):660-665.
152. Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S et al. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2008;11(3):251-253.
153. Nagai M, Re DB, Nagata T et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 2007;10(5):615-622.
154. Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M et al. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(11):4465-4470.
155. Turner BJ, Ackerley S, Davies KE, Talbot K. Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. *Hum Mol Genet* 2010;19(5):815-824.
156. Ferraiuolo L, Higginbottom A, Heath PR et al. Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2011;134(Pt 9):2627-2641.
157. Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2011;7(11):616-630.
158. Andersen PM, Borasio GD, Dengler R et al. Good practice in the management of amyotrophic lateral sclerosis: clinical guidelines. An evidence-based review with good practice points. EALSC Working Group. *Amyotroph Lateral Scler* 2007;8(4):195-213.
159. Miller RG, Jackson CE, Kasarskis EJ et al. Practice parameter update: The care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: multidisciplinary care, symptom management, and cognitive/behavioral impairment (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2009;73(15):1227-1233.
160. Miller RG, Jackson CE, Kasarskis EJ et al. Practice parameter update: The care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: drug, nutritional, and respiratory therapies (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2009;73(15):1218-1226.
161. Chio A, Bottacchi E, Buffa C, Mutani R, Mora G. Positive effects of tertiary centres for amyotrophic lateral sclerosis on outcome and use of hospital facilities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77(8):948-950.
162. van den Berg JP, Kalmijn S, Lindeman E et al. Multidisciplinary ALS care improves quality of life in patients with ALS. *Neurology* 2005;65(8):1264-1267.
163. Cudkowicz ME, Katz J, Moore DH et al. Toward more efficient clinical trials for amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2010;11(3):259-265.
164. Lanka V, Cudkowicz M. Therapy development for ALS: lessons learned and path forward. *Amyotroph Lateral Scler* 2008;9(3):131-140.

165. Zoccolella S, Santamato A, Lamberti P. Current and emerging treatments for amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2009;5:577-595.
166. Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD001447.
167. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 1994;330(9):585-591.
168. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 1996;347(9013):1425-1431.
169. Traynor BJ, Alexander M, Corr B, Frost E, Hardiman O. An outcome study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis--a population-based study in Ireland, 1996-2000. *J Neurol* 2003;250(4):473-479.
170. Bensimon G, Lacomblez L, Delumeau JC, Bejuit R, Truffinet P, Meininger V. A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2002;249(5):609-615.
171. Zinman L, Cudkowicz M. Emerging targets and treatments in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2011;10(5):481-490.
172. Aggarwal S, Cudkowicz M. ALS drug development: reflections from the past and a way forward. *Neurotherapeutics* 2008;5(4):516-527.
173. Leigh PN, Abrahams S, Al-Chalabi A et al. The management of motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74 Suppl 4:iv32-iv47.
174. Bourke SC, Tomlinson M, Williams TL, Bullock RE, Shaw PJ, Gibson GJ. Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 2006;5(2):140-147.
175. Bourke SC, Gibson GJ. Non-invasive ventilation in ALS: current practice and future role. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2004;5(2):67-71.
176. Andersen PM, Borasio GD, Dengler R et al. EFNS task force on management of amyotrophic lateral sclerosis: guidelines for diagnosing and clinical care of patients and relatives. *Eur J Neurol* 2005;12(12):921-938.
177. Desport JC, Torny F, Lacoste M, Preux PM, Couratier P. Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegener Dis* 2005;2(3-4):202-207.
178. Funalot B, Desport JC, Sturtz F, Camu W, Couratier P. High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10(2):113-117.
179. Bouteloup C, Desport JC, Clavelou P et al. Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J Neurol* 2009;256(8):1236-1242.

180. Brownlee A, Palovcak M. The role of augmentative communication devices in the medical management of ALS. *NeuroRehabilitation* 2007;22(6):445-450.
181. Testa D, Lovati R, Ferrarini M, Salmoiraghi F, Filippini G. Survival of 793 patients with amyotrophic lateral sclerosis diagnosed over a 28-year period. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2004;5(4):208-212.
182. Turner MR, Parton MJ, Shaw CE, Leigh PN, Al-Chalabi A. Prolonged survival in motor neuron disease: a descriptive study of the King's database 1990-2002. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74(7):995-997.
183. Zoccolella S, Beghi E, Palagano G et al. Analysis of survival and prognostic factors in amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(1):33-37.
184. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O et al. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(1):6-11.
185. Preux PM, Couratier P, Boutros-Toni F et al. Survival prediction in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Age and clinical form at onset are independent risk factors. *Neuroepidemiology* 1996;15(3):153-160.
186. Chio A, Mora G, Leone M et al. Early symptom progression rate is related to ALS outcome: a prospective population-based study. *Neurology* 2002;59(1):99-103.
187. del Aguila MA, Longstreth WT, Jr., McGuire V, Koepsell TD, van BG. Prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Neurology* 2003;60(5):813-819.
188. Norris F, Shepherd R, Denys E et al. Onset, natural history and outcome in idiopathic adult motor neuron disease. *J Neurol Sci* 1993;118(1):48-55.
189. Millul A, Beghi E, Logroscino G, Micheli A, Vitelli E, Zardi A. Survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis in a population-based registry. *Neuroepidemiology* 2005;25(3):114-119.
190. Magnus T, Beck M, Giess R, Puls I, Naumann M, Toyka KV. Disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: predictors of survival. *Muscle Nerve* 2002;25(5):709-714.
191. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;102(10):3483-3493.
192. Moraleda JM, Ruiz F, Blanquer M, Arriba F. ¿Que son las células madre? *Hematología Mol* 2004;(3):2-5.
193. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 2006;441(7097):1060.
194. Krause DS, Theise ND, Collector MI et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105(3):369-377.
195. Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003;349(6):570-582.

196. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(3):1364-1369.
197. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, Mckercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290(5497):1779-1782.
198. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(8):4080-4085.
199. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425(6961):968-973.
200. Cerny J, Quesenberry PJ. Chromatin remodeling and stem cell theory of relativity. *J Cell Physiol* 2004;201(1):1-16.
201. Hedlund E, Hefferan MP, Marsala M, Isacson O. Cell therapy and stem cells in animal models of motor neuron disorders. *Eur J Neurosci* 2007;26(7):1721-1737.
202. Koch P, Kokaia Z, Lindvall O, Brustle O. Emerging concepts in neural stem cell research: autologous repair and cell-based disease modelling. *Lancet Neurol* 2009;8(9):819-829.
203. Madhavan L, Collier TJ. A synergistic approach for neural repair: cell transplantation and induction of endogenous precursor cell activity. *Neuropharmacology* 2010;58(6):835-844.
204. Kim H, Kim HY, Choi MR et al. Dose-dependent efficacy of ALS-human mesenchymal stem cells transplantation into cisterna magna in SOD1-G93A ALS mice. *Neurosci Lett* 2010;468(3):190-194.
205. Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P et al. Adult stem cell therapy: dream or reality? *Transpl Immunol* 2006;17(1):74-77.
206. Cabanes C, Bonilla S, Tabares L, Martinez S. Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration. *Neurobiol Dis* 2007;26(2):408-418.
207. Bonilla S, Alarcon P, Villaverde R, Aparicio P, Silva A, Martinez S. Haematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that express oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain. *Eur J Neurosci* 2002;15(3):575-582.
208. Bonilla S, Silva A, Valdes L, Geijo E, Garcia-Verdugo JM, Martinez S. Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. *Neuroscience* 2005;133(1):85-95.
209. Insausti CL, Alcaraz A, Garcia-Vizcaino EM et al. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Repair Regen* 2010;18(4):368-377.
210. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol* 2010;25(1):91-98.

211. Moraleda JM, Blanquer M, Gómez-Espuch J et al. Terapia con células madre en enfermedades neurodegenerativas. *Rev Hematol Mex* 2011;12(3):144-148.
212. Moraleda JM. La terapia celular en enfermedades no hematológicas: ¿sueño o realidad? *Rev Hematol Mex* 2011;12(4):239-241.
213. Rodriguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL et al. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J* 2011;44(9):800-806.
214. Rodriguez-Lozano FJ, Moraleda JM. Use of dental stem cells in regenerative dentistry: a possible alternative. *Transl Res* 2011;158(6):385-386.
215. Rodriguez Lozano FJ, Moraleda JM. Mesenchymal dental pulp stem cells: a new tool in sinus lift. *J Craniofac Surg* 2011;22(2):774-775.
216. Eisen A. Amyotrophic lateral sclerosis: A 40-year personal perspective. *J Clin Neurosci* 2009;16(4):505-512.
217. Turner MR, Leigh PN. Disease-modifying therapies in motor neuron diseases - the present position and future developments. In: Shaw P, Strong M., editors. *Motor Neuron Disease*. 2003:497-544.
218. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Milliken M et al. Positive effect of transplantation of hNT neurons (NTera 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2002;174(2):169-180.
219. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12(3):255-270.
220. Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat Biotechnol* 2005;23(7):862-871.
221. Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat Biotechnol* 2002;20(11):1111-1117.
222. Storch A, Schwarz J. Neural stem cells and neurodegeneration. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3(5):774-781.
223. Ourednik J, Ourednik V. Graft-induced plasticity in the mammalian host CNS. *Cell Transplant* 2004;13(3):307-318.
224. Silani V, Cova L, Corbo M, Ciammola A, Polli E. Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2004;364(9429):200-202.
225. Pastor D, Viso-Leon MC, Jones J et al. Comparative Effects between Bone Marrow and Mesenchymal Stem Cell Transplantation in GDNF Expression and Motor Function Recovery in a Motorneuron Degenerative Mouse Model. *Stem Cell Rev* 2011.

-
226. Cao QL, Zhang YP, Howard RM, Walters WM, Tsoulfas P, Whittemore SR. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol* 2001;167(1):48-58.
227. Hammang JP, Archer DR, Duncan ID. Myelination following transplantation of EGF-responsive neural stem cells into a myelin-deficient environment. *Exp Neurol* 1997;147(1):84-95.
228. Pfeifer K, Vroemen M, Blesch A, Weidner N. Adult neural progenitor cells provide a permissive guiding substrate for corticospinal axon growth following spinal cord injury. *Eur J Neurosci* 2004;20(7):1695-1704.
229. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Milliken M et al. Intraspinal implantation of hNT neurons into SOD1 mice with apparent motor deficit. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2001;2(4):175-180.
230. Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Milliken M, Cahill DW, Sanberg PR. hNT neurons delay onset of motor deficits in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* 2001;56(6):525-530.
231. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3908-3913.
232. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(19):10711-10716.
233. Kogler G, Sensken S, Airey JA et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200(2):123-135.
234. Sasaki M, Honmou O, Akiyama Y, Uede T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia* 2001;35(1):26-34.
235. Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia* 2002;39(3):229-236.
236. Inoue M, Honmou O, Oka S, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. *Glia* 2003;44(2):111-118.
237. Kim SU, de VJ. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *J Neurosci Res* 2009;87(10):2183-2200.
238. Mazzini L, Vercelli A, Ferrero I et al. Stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: state of the art. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9(10):1245-1258.
239. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Ratajczak J, Kucia M. Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance. *Exp Hematol* 2008;36(6):742-751.

-
240. Badayan I, Cudkowicz ME. Is it too soon for mesenchymal stem cell trials in people with ALS? *Amyotroph Lateral Scler* 2008;9(6):321-322.
 241. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 2004;10 Suppl:S42-S50.
 242. Matias-Guiu J, Barcia JA, Garcia-Verdugo JM, Galan L, Vela A, Garcia-Ramos R. [Cellular therapy in amyotrophic lateral sclerosis]. *Neurologia* 2008;23(4):226-237.
 243. Insausti CL, Blanquer MB, Olmo LM et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the fat layer on the density gradient separated bone marrow. *Stem Cells Dev* 2012;21(2):260-272.
 244. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous--that is the question. *Exp Hematol* 2005;33(6):613-623.
 245. Rice CM, Scolding NJ. Autologous bone marrow stem cells--properties and advantages. *J Neurol Sci* 2008;265(1-2):59-62.
 246. Zhang C, Zhou C, Teng JJ, Zhao RL, Song YQ, Zhang C. Multiple administrations of human marrow stromal cells through cerebrospinal fluid prolong survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy* 2009;11(3):299-306.
 247. Slavin S, Kurkalli BG, Karussis D. The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Clin Neurol Neurosurg* 2008;110(9):943-946.
 248. McClelland S, III, Bethoux FA, Boulis NM et al. Intrathecal baclofen for spasticity-related pain in amyotrophic lateral sclerosis: efficacy and factors associated with pain relief. *Muscle Nerve* 2008;37(3):396-398.
 249. Nagano I, Shiote M, Murakami T et al. Beneficial effects of intrathecal IGF-1 administration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 2005;27(7):768-772.
 250. Ohta Y, Kamiya T, Nagai M et al. Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 2008;86(13):3028-3037.
 251. Poirier C, Blot S, Fernandes M et al. A high-resolution genetic map of mouse chromosome 19 encompassing the muscle-deficient osteochondrodystrophy (mdf-ocd) region. *Mamm Genome* 1998;9(5):390-391.
 252. Blot S, Poirier C, Dreyfus PA. The mouse mutation muscle deficient (mdf) is characterized by a progressive motoneuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54(6):812-825.
 253. Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R et al. Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2003;4(3):158-161.

-
254. Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R. Stem-cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2004;364(9449):1936-1937.
 255. Blanquer BM, Moraleda Jimenez JM, Iniesta MF et al. Neurotrophic Bone Marrow Cellular Nests Prevent Spinal Motoneuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients: A Pilot Safety Study. *Stem Cells* 2012.
 256. Blanquer M, Perez-Espejo MA, Martinez-Lage JF, Iniesta F, Martinez S, Moraleda JM. A surgical technique of spinal cord cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Methods* 2010;191(2):255-257.
 257. Blanquer M, Perez Espejo MA, Iniesta F et al. [Bone marrow stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: technical aspects and preliminary results from a clinical trial]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2010;32 Suppl A:31-37.
 258. Ioannidis JP, Evans SJ, Gotzsche PC et al. Better reporting of harms in randomized trials: an extension of the CONSORT statement. *Ann Intern Med* 2004;141(10):781-788.
 259. Cedarbaum JM, Stambler N. Performance of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS) in multicenter clinical trials. *J Neurol Sci* 1997;152 Suppl 1:S1-S9.
 260. Norris FH, Jr., Fallat RJ, Calanchini PR. Increased paralysis induced by guanidine in motor neuron disease. *Neurology* 1974;24(2):135-137.
 261. John J. Grading of muscle power: comparison of MRC and analogue scales by physiotherapists. Medical Research Council. *Int J Rehabil Res* 1984;7(2):173-181.
 262. De Troyer A, Kirkwood PA, Wilson TA. Respiratory action of the intercostal muscles. *Physiol Rev* 2005;85(2):717-756.
 263. Trotti A, Colevas AD, Setser A et al. CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol* 2003;13(3):176-181.
 264. Polkey MI, Green M, Moxham J. Measurement of respiratory muscle strength. *Thorax* 1995;50(11):1131-1135.
 265. Cruccu G, Aminoff MJ, Curio G et al. Recommendations for the clinical use of somatosensory-evoked potentials. *Clin Neurophysiol* 2008;119(8):1705-1719.
 266. Iber C, Ancoli-Israel S, Cheeson A, Quan SF. *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events- Rules, Terminology and Technical Specifications*. 1st ed. Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine; 2007.
 267. Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 2007;61(5):427-434.
 268. Morren JA, Galvez-Jimenez N. Current and prospective disease-modifying therapies for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;21(3):297-320.

269. Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 2012;3:CD001447.
270. Suzuki M, Svendsen CN. Combining growth factor and stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Neurosci* 2008;31(4):192-198.
271. Boillee S, Vande VC, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 2006;52(1):39-59.
272. Deda H, Inci MC, Kurekci AE et al. Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up. *Cytotherapy* 2009;11(1):18-25.
273. Martinez HR, Molina-Lopez JF, Alez-Garza MT et al. Stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis patients. Methodological approach, safety, and feasibility. *Cell Transplant* 2012.
274. Martinez HR, Gonzalez-Garza MT, Moreno-Cuevas JE, Caro E, Gutierrez-Jimenez E, Segura JJ. Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cytotherapy* 2009;11(1):26-34.
275. Mazzini L, Ferrero I, Luparello V et al. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp Neurol* 2010;223(1):229-237.
276. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I et al. Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study. *Cytotherapy* 2012;14(1):56-60.
277. Glass JD, Boulis NM, Johe K et al. Lumbar Intraspinal Injection of Neural Stem Cells in Patients with ALS: Results of a Phase I Trial in 12 Patients. *Stem Cells* 2012.
278. Priller J, Flugel A, Wehner T et al. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 2001;7(12):1356-1361.
279. Appel SH, Engelhardt JI, Henkel JS et al. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2008;71(17):1326-1334.
280. Biffi A, Capotondo A, Fasano S et al. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J Clin Invest* 2006;116(11):3070-3082.
281. Biffi A, De PM, Quattrini A et al. Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 2004;113(8):1118-1129.
282. Cashman N, Tan LY, Krieger C et al. Pilot study of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Muscle Nerve* 2008;37(5):620-625.
283. Nefussy B, Artamonov I, Deutsch V, Naparstek E, Nagler A, Drory VE. Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor administration for treating amyotrophic lateral sclerosis: A pilot study. *Amyotroph Lateral Scler* 2010;11(1-2):187-193.