

Biomarkatzaile molekularrak Alboko Esklerosi Amiotrofikoaren diagnostikoan

(Molecular Biomarkers for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis)

Pilar Vivas Álvarez¹, Leire Borrega-Román^{2,4}, Miquel Saumell-Esnaola^{2,4},
Imanol González-Burguera^{3,4}, Gontzal García del Caño^{*3,4}

¹ Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Vitoria-Gasteiz, Araba

² Farmakologia Saila. Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU),
Vitoria-Gasteiz, Araba

³ Neurozientziak Saila. Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU),
Vitoria-Gasteiz, Araba

⁴ Bioaraba, Neurofarmakologia Zelularra eta Molekularra, Vitoria-Gasteiz

LABURPENA: Alboko esklerosi amiotrofikoa (AEA) gaixotasun neurodegeneratibo heterogeneo eta sendaezina da. Goiko eta beheko neurona motorren endekapena eta bizkarmineko albo kordioaren esklerosia dira zigilu histopatologiko nagusiak. Adierazpen klinikoetan aldakortasun handia dagoen arren, ahultasun orokorra, faszikulazioak eta espasmoak gertatzen dira neurona motorren endekapenaren eta muskulu-atrofiaren ondorioz, eta baita portaeira- eta kognizio-osaldirak ere garuneko kalte zabalak dela eta. Mutazio genetikoei gaixotasunaren bi adierazpen nagusietan (AEA esporadikoa eta familiara) eragiten dute. Identifikatu diren gene implikatu artean, C9orf72, SOD1, TARDBP eta FUS dira nagusiak, baina gene horiek AEA esporadikoaren kasuen % 15 eta familiara AEA kasuen % 66 baino ez dituzte azaltzen. Egungo tratamenduek sintomatologia moteltzea dute helburu, eta dauden terapia farmakologikoak urriak eta eraginkortasun txikiak dira, gehienbat diagnostikoa beranduegi egiten delako. Izan ere, AEA diagnostikatzeko eta gaixotasunaren larritasuna jarraitzeko erabiltzen diren eskalak sintomen eta zeinuen balorazioan oinarritzen dira, eta horiek kalte neuronalak dagoeneko gertatu denean adierazten dira. Hortaz, premiazkoa da AEAREN diagnostiko goiztiarrerako biomarkatzaile espezifiko eta fidagarriak aurkitzea. Orain arte, fluido biologikoetan gehien aztertutako dirak eta emaitzarik sendoenak eman dituzten biomarkatzaileak C9orf72 genetik eratorritako proteinak, TDP-43 proteinaren aldaerak eta neurofilen apuntitaeak dira. Hala ere, hainbat ikerlanek hanturaren markatzaileak eta markatzaile metabolikoen garrantzia ere azpimarratu dute AEAREN diagnostiko-biomarkatzaile gisa. Dena den, oraindik ez da aurkitu behin betiko biomarkatzaileak AEA estratifikatzeko, beste entitate nosologiko batzuetatik bereizteko eta gaixotasunaren jarraipena egiteko, eta ebidentziek biomarkatzaileen konbinazioak beharko direla erakusten dute. Nolanahi ere, biomarkatzaile berriak aurkitzeko, ikerketa gehiago egin behar da gaixotasuna bera ulertzeko; izan ere, AEA interakzio-mekanismo ugariaren emaitza da, eta urrun gaude etiopatogenia eta fisiopatologia beren osotasunean ulertzetik.

HITZ GAKOAK: Alboko Esklerosi Amiotrofikoa, Biomarkatzaileak, C9orf72, SOD1, TARDBP, FUS.

ABSTRACT: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a heterogeneous and incurable neurodegenerative disease. Upper and lower motor neuron degeneration and lateral spinal cord sclerosis are the main histopathologic hallmarks. Despite the great variability in clinical manifestations, general weakness, fasciculations, and spasms occur in all cases due to motor neuron degeneration and muscle atrophy, and this is accompanied by behavioural and cognitive alterations as a result of extensive brain damage. Genetic mutations influence the two main types of the disease: sporadic ALS and familial ALS. Among the identified implicated genes, the main ones are C9orf72, SOD1, TARDBP and FUS, although these genes only explain 15% of sporadic ALS cases and 66% of familial ALS. Current treatments aim to slow down symptoms, and existing pharmacological therapies are scarce and of low efficacy, mainly because the disease is diagnosed too late. In fact, the scales for the diagnosis and monitoring of the severity of ALS are based on the assessment of symptoms and signs, which are expressed when neuronal damage has already occurred. Therefore, it is urgent to find specific and reliable biomarkers for the early diagnosis of ALS. To date, the most studied biomarkers in biological fluids and that have given the most solid results are the proteins derived from the C9orf72 gene, the variants of the TDP-43 protein and the neurofilament subunits. However, various studies have also highlighted the importance of inflammatory and metabolic markers as diagnostic biomarkers for ALS. Definitive biomarkers that allow differential diagnosis, stratification and monitoring of ALS, have not been found yet, and the evidence shows the combination of biomarkers will be necessary. In any case, in order to find new biomarkers, additional research is required to help understand the disease itself, since ALS is the product of numerous interaction mechanisms and we are far from fully understanding the etiopathogenesis and pathophysiology of the disease.

KEYWORDS: Amyotrophic lateral sclerosis, Biomarkers, C9orf72, SOD1, TARDBP, FUS.

* **Harremanetan jartzeko / Corresponding author:** Gontzal García del Caño. Neurozientziak Saila. Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Vitoria-Gasteiz, Araba. – gontzal.garcia@ehu.eus – https://orcid.org/0000-0002-7098-0986

Nola aipatu / How to cite: Vivas Álvarez, Pilar; Borrega-Román, Leire; Saumell-Esnaola, Miquel; González-Burguera, Imanol; García del Caño, Gontzal (2024). «Biomarkatzaile molekularrak Alboko Esklerosi Amiotrofikoaren diagnostikoan». *Ekaia*, 45, 2024, 35-50. (https://doi.org/10.1387/ekaia.24470).

Jasotze-data: 2023, otsailak 12; Onartze-data: 2023, azaroak 9.

ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2024 UPV/EHU

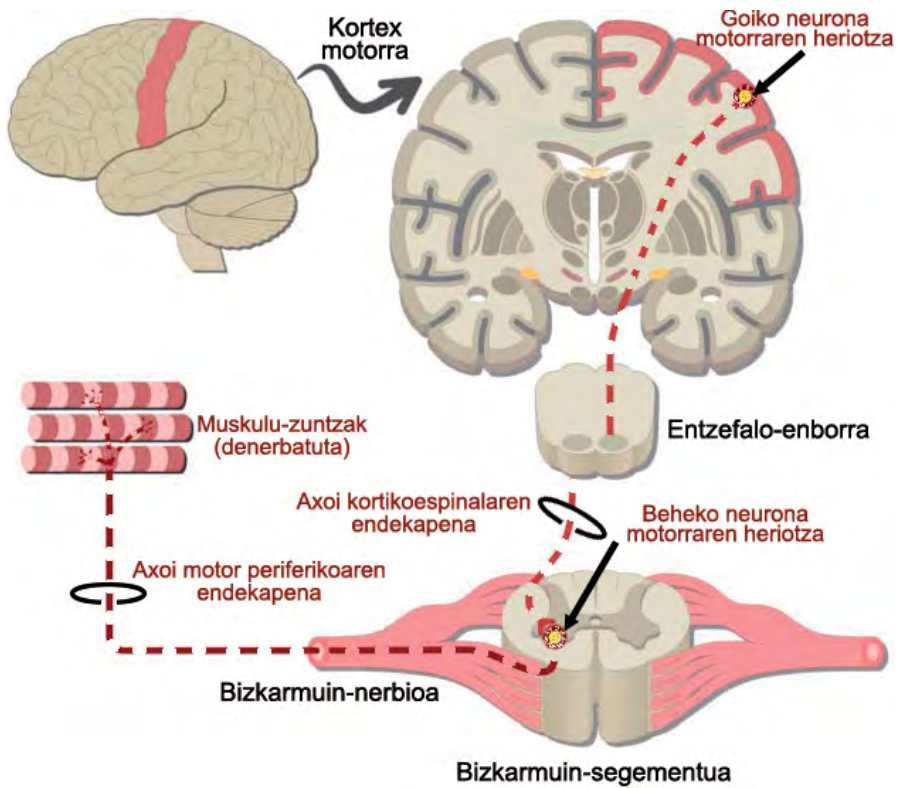


Lan hau Creative Commons Aitortu-EzKomertziala-PartekatuBerdin 4.0 Nazioartekoa lizentzia baten mende dago

1. SARRERA

Sendaezina eta hilgarria den Alboko Esklerosi Amiotrofikoa (AEA) neurona motorren gaixotasun neurodegeneratiborik ohikoena da (guztien % 90). Mundu mailako epidemiologia aztertu zuen azterlan baten arabera, 2013an, AEAREN batez besteko intzidentzia 2,08/100.000 eta 1,8/100.000 zen Europan eta Ipar Amerikan (AEB eta Kanada), hurrenez hurren, eta batez besteko prebalentzia 5,40/100.000 eta 3,40/100.000 Europan eta AEBn, hurrenez hurren [1], eta gora egin du azken urteetan. Desberdintasun genetikoak eta ingurumen-faktoreek ez ezik, baldintza sozioekonomikoek ere eragin handia dute tasa epidemiologikoetan. Hala, AEAREN intzidentzia eta prebalentzia handiagoa da herrialde aberatsetan pobreetan baino; izan ere, batez besteko bizi-itxaropena handiagoa da herrialde aberatsetan, eta AEAK 50 eta 70 urte bitarteko populazioari eragiten dio gehienbat. Gainera, kasu gehiago detektatzen dira herrialde aberatsetan [2, 3].

AEAREN ezaugarri bereizgarrietako bat neurona motorren heriotza eta endekapena da. Kalteak erraboil eta bizkarmuineko neurona motorrei (beheko neurona motorrak) zein garun-kortexeko eremu motor primarioko neuronei (goiko neurona motorrak) eragiten die. Horrez gainera, bizkarmuineko alboko kordioan dagoen azao kortikoespinalaren esklerosia gertatzen da AEAN, eta hortik dator «alboko esklerosi» izena [4, 5]. «Amiotrofiko» izena muskulu eskeletikoaren masan gertatzen den gutxitze nabarmenetik dator [6] (1. irudia). Gaixotasuna helduaroaren erdialdean hasi arren (kasu gehienetan, 55 urtetik aurrera), edozein adinetan ager daiteke eta 1,2-1,5 aldiz gehiago eragiten die gizonei emakumei baino [7]. Adierazpena fokala da hasieran, baina gorputzeko beste eskualde batzuetara hedatzen da ondoren [8]. Kasuen % 80an, bizkarmuineko neurona motorren kaltearen ondorioz, gaixotasuna gorputz-adarren ahultasun asimetriko gisa adierazten da hasieran eta, ondoren, erraboileko neuronan kontrolpean dauden muskuluetara eta arnas muskuluetara hedatzen da (bizkarmuin-hasierako AEA). Kasuen beste % 20an, lehen kaltea erraboileko neurona motorretan gertatzen da (erraboil hasierako AEA). Kasu horietan, hasiera berantiarra ohi da (70 urtetik aurrera) eta, mihi eta faringeko muskuluen ahultasunaren ondorioz, disartria eta disfonia ditu adierazpen nagusiak [9]. Bizkarmuin-hasierako gaixotasuna ohikoagoa da gizonen artean (kasuen % 68,4), eta emakumeen artean, berriz, erraboil hasierakoa (kasuen % 52,2) [2, 9]. Ezaugarri histopatologikoak, hala nola muskuluen atrofia, garun-kortexaren bolumenaren murrizketa, bizkarmuineko alboko kordioaren esklerosia eta astroglia, neurona motorren endekapenarekin erlazionatuta daude [5, 10].



1. irudia. AEA gaixotasunak, batez ere, goiko eta beheko neurona motorrei eragiten die. Irudian adierazten den bezala, goiko neurona motorren axoiak bizkarmuina proiektatzen dira beheanzko bide kortikoespinalaren bidez; ordea, bizkarmuineko beheko neurona motorrek proiektzio periferikoak ematen dituzte muskulu eskeletikoetara. Moldatutako irudiaren iturria: <https://getbodysmart.com>

AEAREN zeinu eta sintoma motorrak nabarmen desberdinak dira kalte-tutako neurona motorrak behekoak ala goikoak diren. Hala, bizkarmuineko eta erraboileko beheko neurona motorren kalteak ahultasun orokorra, hiporreflexia, faszikulazioak eta kalanbreak dakartza. Ordea, goiko neurona motorren kalteak hiperreflexia, Babinski-ren zeinua eta muskulu-tonuaren handitzea ditu ondorio nagusi [4, 6]. Zeinu eta sintoma motorrez gain, kognizio- eta portaera-asaldurak ere agertzen dira AEA pairatzen duten pazienteetan [9], eta hitz-jarioan, hizkuntza eta kognizio soziala dira gehien ukitutako domeinuak [8]. AEA pazienteen % 10 inguruk apatia eta sinpatiaren galera pairatzen du, eta % 15-20k demenzia frontotemporal (FTD, *frontotemporal dementia*) deritzon anomalia kognitibo progresiboa [11].

AEA bi modu klinikotan azaltzen da, AEA esporadikoa eta fami-
liako AEA (kasuen % 90 eta % 10, hurrenez hurren). Patologikoki oso
antzekoak diren arren, AEA esporadikoaren agerpen adina (46 urte, ba-
tez beste) goiztiarragoa da familiakoa baino (56 urte, batez beste) [2, 4].
Familiako AEA autosomiko gainartzailea da kasu gehienetan [5, 8] eta
harekin erlazionatutako mutaziorik ohikoek (maiztasun beherakorren
arabera ordenatuta) C9orf72 (*chromosome 9 open reading frame 72*),
SOD1 (*superoxide dismutase 1*), TARDBP (*TAR DNA binding protein*)
eta FUS (*fused in sarcoma protein*) genei eragiten diete [6, 10, 12]. Gene
horien kalteek AEA esporadikoko kasuen % 15 azaltzen dute eta fami-
liako AEAKo kasuen % 66 [13]. AEA mota bietan, ingurumen-faktoreak
ere gero eta gehiago ari dira ikertzen. Horien artean, pestizidak, metal as-
tunak (beruna, kadmioa, burdina, selenioa), herbizidak eta antzeko subst-
tanziekiko esposizioa AEA garatzeko arrisku-faktore izan daitezkeela az-
tertzen ari da [3, 14]. Toxikoez gainera, AEBn egindako kasu-kontrolako
ikerketa baten arabera, traumatismo kranioentzefalikoak, eremu elektro-
magnetikoak eta lan mota batzuek AEA garatzeko arriskua areagotu de-
zakete [15].

2. MEKANISMOAK ETA FISIOPATOLOGIA

AEAn gertatzen diren eraldaketa zelularrak osorik ezagutzen ez diren
arren, badirudi asaldura orokorra eragingo luketen interakzio-mekanismo
ugariren emaitza direla. Eragile genetiko eta molekular indibidualak joka-
tzen duten papera ez da guztiz definitu, eta okerrekoa litzateke pentsatzea
faktore horiek guztiak AEA kasu guztietan inplikaturik daudela, gaixota-
suna heterogeneoa baita [10]. AEAREN mekanismo fisiopatologikoak era-
bat ezagunak ez diren arren, bi kategoria nagusitan sailkatutako meka-
nismo batzuk proposatu dira, oinarri genetikoaren edo ez-genetikoaren
arabera.

2.1. Oinarri genetikorik ez duten mekanismoak

Neurona motorrak bereziki sentikorrek dira glutamato bidezko kaltzio-
exitotoxikotasuna pairatzeko. Izan ere, bestelako neuronekin alderatuta,
gaitasun gutxiago dute zelula barneko kaltzioa moteltzeko. Horrez gainera,
GluR2 azpiunitateak urriak dira neurona motorren α -amino-3-hidroxi-5-
metilo-4-isoxazolpropioniko (AMPA) motako glutamato hartzaile postsin-
aptikoetan. GluR2 azpiunitateek AMPA hartzaileen kaltzio-konduktan-
tzia murrizten dutenez, neurona motorrek kaltzioarekiko iragazkorragoak
dira [16,17]. Are gehiago, AEA pazienteen % 56ren neurona motorretan
GluR2 kodetzen duen RNA mezulariaren edizio ez-osoak aurkitu da. Ze-
hazki, GluR2 azpiunitatearen bigarren mintz-zeharreko sekuentzian, glu-

tamina ordeztu, arginina jartzen duen (Q/R ordezkapena) edizioaren ondorioz, AMPA hartzailaren kaltzio-konduktantzia areagotu egiten da [18]. Bestalde, EAAT2 (*excitatory amino acid transporter 2*) garraiatzaile astrogliala funtzionalki kaltetuta dago AEA gaixotasunean. Ondorioz, glutamato bidezko eszitotoxikotasuna sortzen da, EAAT2 glutamato sinaptikoa ezabatzeaz arduratzen den garraiatzaile nagusia baita [10].

Oligodendrozitoen endekapenaren ondorioz, AEA gaixotasunean garraio axonala kaltetuta dagoela ikusi da [12]. Izan ere, oligodendrozitoek mielinazko zorroak sortzen dituzte, axoiak neuronetatik isolatzen dituztenak eta axoi-garraioan egundoko garrantzia dutenak. Oligodendrozitoen endekapenaren mekanismo gisa, axonopatia eragin dezakeen laktatoaren metabolismo eta garraioaren disfuntzioa proposatu da [10]. Hala, normalean espresio maila altua duen MCT1 (*monocarboxylate transporter 1*) laktato garraiatzailea murriztuta dago AEA pazienteen zein animalia-ereduen kortez motorreko oligodendrozitoetan [19]. Nabarmenki, bizkarmuineko mielinaren alterazioak sintomak agertu aurretik adierazten dira AEA gaixotasunaren sagu-ereduetan [10].

2.2. Mutazio genetikoei lotutako mekanismoak

Gorago aipatu den bezala, AEArekin erlazionatutako mutaziorik ohikoenek C9orf72, SOD1, TARDBP eta FUS geneei eragiten diete [6, 10]. Hala, GGGGCC hexanukleotidoaren errepikapen-hedapena aurkitu da C9orf72 genearen eskualde ez-kodetzaile batean. Mutazio horrek nabarmen murrizten du C9orf72 proteinaren adierazpena garunean, baina ez dakigu hori AEArekin zeinuak eta sintomak agertzearekin lotuta ote dagoen. Nabarmenki, mutazio hori duten AEA paziente batzuek FTD ere garatzen dute eta C9-AEA-FTD gisa diagnostikatzen dira. [6]. SOD1 geneak organismo osoko zeluletan ugaria den eta funtzio gisa oxigeno espezie erreaktiboak (ROS, *reactive oxygen species*) ezabatzen duen superoxido dismutasa 1 (Sod1) entzima kodetzen du. AEA pazienteen SOD1 genean, 200 mutaziotik gora identifikatu dira, eta Estatu Batuetako pazienteen erdiek balina dute alaninaren ordeztu Sod1 bosgarren hondarrean (A5V mutazioa), proteinaren funtzioari erasaten diona. A5V mutazioa seinale eta sintoma larrienekin lotzen da, neurona motorrak bereziki sentikorrek baitira SOD1 genearen mutazioekiko. TARDBP geneak ehun gehienetan adierazten den eta proteinen sintesian inplikaturik dagoen TDP-43 proteina nuklearra kodetzen du. AEA pazienteetan, mRNA prozesatzeari erasaten dioten 60 mutaziotik gora identifikatu dira TARDBP genean. C9orf72 genearen mutazioen kasuan bezala, TARDBP genearen mutazioek FTD eragiten dute AEA pairatzen duten paziente batzuegan, eta, berriro ere, ez dago argi horren zergatia. FUS geneak ehun gehienetan adierazten den FUS proteina nuklearra kodetzen du. Proteina horrek transkripzioaren aktibazioan eta mRNA-ren prozesatzean inplikaturik dago.

teaz gain, DNAREN akatsak konpontzen ere laguntzen du. AEA pazienteen FUS genean 85 mutazio baino gehiago identifikatu dira, besteak beste, mRNA-ren garraioari eragiten diotenak, bereziki neurona motorretan. Mechanismo zehatza ezezaguna bada ere, neuronen heriotza FUS proteinaren metaketaren ondorioz gertatzen omen da. Gainerako AEA pazienteekin alderatuta, FUS genearen mutazioa dutenek goizago garatzen dute, gaixotasuna eta bizi-itxaropen txikiagoa dute [2, 11, 12].

3. TRATAMENDUA

AEA pazienteen bizi-kalitatea hobetzeko, tratamendu sintomatikoak eta laguntza-arreta ezinbestekoak dira. Jateko eta arnasteko zailtasuna, muskulu atrofia edo/eta gose eza gaixotasunaren ohiko ezaugarriak dira. Disfagia larria garatzen duten AEA pazienteei gastrostomia bidezko elikadura gomendatu ohi zaie gorputz-pisuaren % 10etik gora galdu dutenean. Interbentzio horrek, elikadura enterala ahalbidetzeaz gain, sendagaien administrazioa errazten du [8]. Arnas gutxiegitasuna dagoenean, aireztapen ez-inbaditzaileak 7 hilabete inguru luzatzen du biziraupena, baina ezin da kasu guztietan erabili. Bereziki narriadura kognitiboa edo erraboi-kaltea duten pazienteetan, diafragmaren estimulazioa erabiltzen da arnas gutxiegitasuna konpentsatzeko [8].

Tratamendu farmakologikoei dagokienez, bi sendagaik dute AEBko FDA (*Food and Drug Administration*) agentziaren onespena: Riluzol eta Edaravone [4, 15, 20]. Europan, ordea, Riluzol da erabil daitekeen farmako bakarra [1, 10]. Riluzolak transmisio glutamatergikoa gutxitzen duela proposatu da, baina ez da aurkitu konposatu horren afinitate handiko lotze tokirik transmisio glutamatergikoan parte hartzen duten hartzaile edo erretenetan. Gainera, glutamato sinaptikoaren kontzentrazioak behera modulatu dituzten beste terapia batzuk ez dira eraginkorrak izan [8, 11]. Riluzolaren eraginak nabarmenak dira gaixotasunaren garai goiztiarretan, eta ikusi da kalte neuronal moteldu dezakeela. Farmako horrek 12 hilabete inguru luzatzen du biziraupena, baina hobekuntza funtzionalen ebidentzia oso urria da [4, 8, 14]. Edaravonek, oxigeno espezie erreaktiboak ezabatuz, estres oxidatiboa moteltzen duela ikusi da. Horrela, goiko eta beheko neurona motorrak babestuko lituzke. Gainera, eragin antiapoptosikoak eta antiinflamatorioak dituela ikusi da [15]. Edaravonek gaixotasunaren progresioa murrizten du, baina Riluzolek ez bezala, ez du biziraupena luzatzen. Horregatik, bi farmakoen konbinazioak eragin terapeutikoak hobetu ditzakeela proposatu da [11].

4. BIOMARKATZAILE MOLEKULARRETAN OINARRITUTAKO DIAGNOSTIKO-ESTRATEGIA BERRIAK

Gaur egun, zeinuetan oinarritutako diagnostikoa azterketa elektrofisiologikoetan (elektromiografia eta nerbio-kondukzioa) oinarritzen da gehienbat [21], eta, neurri txikiago batean neuroirudi-tekniketan [22, 23], likido zefalorrakideoaren (LZR) analisisia eta nerbio edo muskuluetako biopsiak oso gutxitan erabiltzen diren bitartean [14, 24]. Dena den, oraindik ere endekapen-zeinu eta sintometan oinarritutako *El Escorial* irizpideak [9] eta ALSFRS-R (*ALS Functional Rating System-Revised*) izeneko eskala [25] dira diagnostikorako gehien erabiltzen direnak.

AEAREN ezaugarri kliniko eta fenotipiko heterogeneoek eta progresioaren abiadura aldakorrek diagnostikoa zailtzen dute. Izan ere, markatzaile molekular biologikorik edo proba espezifikorik ez egoteak AEAREN diagnostikoa benetako erronka bihurtzen du [8,9]. Hala, AEAREN batez besteko diagnostiko adina oso berandu gertatzen da ($64,4 \pm 2,9$) [26], eta horrek tratamenduaren arrakasta zaildu egiten du, nabarmen mugatzen baititu terapia neurobabesleak garaiz hasteko aukerak. Beraz, premiazkoa da AEAREN biomarkatzaile espezifiko eta fidagarriak identifikatzea [4-6, 27]. Horien artean, gehien ikertu direnak eszitotoxikotasun-prozesuetan, estres oxidatiboan, neuroinflamazioan, disfuntzio metabolikoan eta neuronen endekapenean inplikaturako molekulak dira [4].

4.1. Biomarkatzaile genetikoak eta Diagnostiko diferentziala

Analisi genetikoak gaixotasunaren progresioa iragartzen lagun dezake, eta AEAREN arrisku-faktore kontsidera daitezkeen gene posibleen kopuruak gora egiten du etengabe [11], baina lau dira familiako AEAREN kasuen % 66en oinarrian daudenak: C9orf72, SOD1, TARDBP eta FUS [13].

Normalean, TARDBP geneak kodetzen duen TDP-43 proteina neuronan nukleoan egoten da azido nukleikoei lotuta, baina estres baldintzetan, neurotoxikotasuna eragiten duten TDP-43 hiperfosforilatuen agregatuak metatzen dira neurona motorren zitoplasman. Prioiekin gertatzen denaren antzeko mekanismo baten bidez, TDP-43 proteinen toleste okerra aldameneko proteinetara zabalduko litzateke, zeinak hasiera fokaleko gaixotasunaren hedapena azalduko lukeen [2, 7, 23]. SOD1 eta FUS geneen mutazioak dituzten kasuetan izan ezik, AEA esporadikoa edo familiakoa izan, TDP-43 proteinen agregatuak aurkitu dira paziente gehien-gehien (% 95-97) LZRn [28]. Beraz, TDP-43 agregatuen presentzia LZRn biomarkatzaile gisa proposatu da [11, 29, 30], nahiz eta laginak hartzeko teknika nahiko inbaditzailea izan. Bestalde, familiako AEA (C9orf72 genearen mutazioaren eramaileak) eta AEA esporadikoaren laginak alderatu dituen ikerketa batek desberdintasunak frogatu ditu TDP-43 proteinen al-

daeretan. Beraz, TDP-43 biomarkatzailearen erabilerak, AEAREN diagnostikoan ez ezik, gaixotasuna sailkatzen ere lagun lezake [11]. Zoritxarrez, oraindik ikerketa gutxi dago TDP-43 markatzailea detektatzeko teknika ez oso inbaditzaileen bidez, odol-analisiak kasu [29]. Nabarmenki, SOD1 mutazioari lotutako AEA (SOD1-AEA) pairatzen duten pazienteetan ez da TDP-43 patologiarik agertzen, eta gaizki tolestutako SOD1 proteinen presentzia neurona motorretan SOD1-AEAREN zigilu neuropatologikoa da [23]. FUS genearen mutazioak dituzten AEA pazienteen neurona motoren zitoplasman, FUS proteina-aldaeren agregatuak agertzen dira [23]. FUS aldaera agregatuen presentzia funtzio zelularra hondatzearen kausa izan daiteke, eta AEAREN hasiera goiztiarrarekin erlazionatzen da. Modu interesgarrian, horrelako profil genetikoa duten AEA pazienteetan, ez da TDP-43 patologiarik atzematen. Beraz, SOD1 bezala, FUS ere TDP-43-tik independentea da [12].

4.2. DPR proteinak, TDP-43 aldaerak eta neurofiruak

Dipetido-errepikapen proteinak (DPR, *dipeptide-repeat proteins*), TDP-43 aldaerak eta neurofiruak (NF) fluido biologikoetan aurki daitezkeen biomarkatzaileak interesgarrienak dira AEAREN diagnostikorako [11].

DPRak GGGGCC hedapena duten C9orf72 geneetatik eratorritako proteinetako polidipeptidoak dira. Sortutako transkriptoek AUG haste-kodoi kanonikorik ez dutenez, RAN-itzulpena (*repeat associated non-AUG translation*) gertatzen da, hedatutako RNA sekuentziak osatutako bigarren mailako egitura baten menpe omen dagoena. C9orf72 genearen mutazioak eragindako AEAREN kasuan (C9-AEA-FTD), RNA-itzulpena *sense* zein *antisense* transkriotoen hiru irakurketa-markoetan gerta daiteke, eta horren ondorioz bost DPR desberdin sortzen dira: glizina-alanina (poli-GA) eta glizina-arginina (poli-GR) *sense* GGGGCC errepikapenetatik, prolina-arginina (poli-PR) eta prolina-alanina (poli-PA) *antisense* GGCCCC errepikapenetatik, eta glizina-prolina (poli-GP) *sense* zein *antisense* transkriptoetatik [6]. Horietatik poli-GA, poli-PR eta poli-GR toxikoak dira *in vitro* eta animalia-ereduetan [31]. DPR horiek bat datoz C9-AEA-FTD diagnostikoa duten pazienteen nerbio-sistema zentrolean oso zabaldua dauden neuronen inklusio intranuklear eta zitoplasmatikoekin (ubikitina eta P62 positibo, baina TDP-43 negatiboak) [6].

Gorago azaldu den bezala, beste markatzaile batzuen azterketarekin konbinatuta, TDP-43 proteinaren aldaera desberdinen identifikazioak diagnostiko diferentzialean lagun dezake. AEA eta FTD pazienteen LZRn, TDP-43 maila altuagoak aurkitu dira pertsona osasuntsuetan baino, baina ez da desberdintasunik aurkitu C9orf72 genean GGGGCC hexanukleotidoen hedapenak dituzten edo ez dituzten artean. C9-AEA-FTD eta AEA esporadikoa duten pazienteen plasma-laginak antigorputz espezifikoak az-

tertuz, desberdintasunak aurkitu dira TDP-43 proteinen aldaeren konposizioan. Beraz, antigorputz horiek, AEAREN diagnostikoan ez ezik, gaixotasunaren aldaera desberdinak bereizten ere lagun lezakete [11].

Neurofiriak neuronen zitoplasman dauden IV. motako tarteko firuak dira eta neuronen zitoeskeletoa osatzen dute mikrotubulu eta mikrofiruekin batera. Masa molekular desberdineko hiru katez osatuta daude: astuna (NF-H), ertaina (NF-M) eta arina (NF-L). AEA gaixotasunean, axoiak kaltetzen direnean edo neuronen endekapena gertatzean, neurofiriak LZRn zein odolean agertzen dira [11,20,32]. NF-L kateen kontzentrazio serikoek % 90etik gorako sentsibilitatea eta espezifikotasuna dute AEA duten pazienteak kontrol osasuntsuetatik bereizteko [13]. Hala, LZR eta plasmako neurofiri mailek gaixotasunaren progresioa aurreikustea ahalbidetzen dute, eta tratamendu immunomodulatzaileen eta neurobabetesleen erantzunak monitorizatzeko erabil daitezke eta, halaber, pronostikoa aurreikusteko [20,33]. LZRn neurtutako NF-L eta NF-H fosforilatuen kontzentrazioek sentsibilitate (% 77 eta % 83, hurrenez hurren) eta espezifikotasun (% 85 eta % 77, hurrenez hurren) handia dute AEA pazienteak AEA gaizki diagnostikatutako (AEA mimetikoak) pazienteetatik bereizteko eta korrelazio moderatua dute progresioarekin. Serumeko NF-L azpiunitateen azterketa AEA duten pazienteak kontrol osasuntsuetatik bereizteko oso sentikorra eta espezifikoa bada ere, ez da konparaziorik egin AEA duten eta AEA gaizki diagnostikatuta duten pazienteen artean. NF-L katearen kontzentrazio plasmatikoa gertatzen diren aldaketak AEAREN estratifikazio klinikoarekin erlazionatzen dira; hortaz, gaixotasunaren progresioaren biomarkatzaile gisa erabilgarria izan daiteke [8].

4.3. Ubikitina C-terminal Hidrolasa L1

Ubikitina C-terminal Hidrolasa L1 (UCHL1) proteina espresioa altua da nerbio-sistema zentrolean (garuneko proteina neuronal guztien % 1-5). UCHL1-ek ubikitina-proteasoma seinaleztapenean eta nerbio-sistemaren mantentze-lanetan eginkizun garrantzitsua duela iradoki da, eta, halaber, axoiaren funtzioa eta egonkortasuna mantentzen ditu. Izan ere, UCHL1 genea ezabatu duten saguetan, axoien endekapena eta heriotza neuronal atzematen dira. Ikerketa baten arabera, UCHL1 mailak nabarmenki altu daude LZRn eta serumean AEAREN aldi goiztiarretan, betiere beste gaixotasun neurodegeneratiboak dituzten pazienteen laginekin alderatuta. Beraz, UCHL1 aukera berriak eskaintzen ditu markatzaile gisa AEAREN diagnostiko goiztiarrerako. Hala ere, denborarekin UCHL1en beheranzko joera sumatu bazen ere, ez zen desberdintasun esanguratsurik ikusi AEAREN aldi goiztiarrean edo geroago egindako laginketen artean. Bestalde, UCHL1en kontzentrazio serikoek eta sintomen iraupenak alderantzizko korrelazioa dute, eta, are gehiago, UCHL1en maila serikoak eta kaltetutako neurona motoreen narriaduraren hedapen mailak korrelazio positiboa dute [34].

4.4. Hanturaren biomarkatzaileak

Hainbat ikerlanek hanturaren bitartekariak AEAREN diagnostikoan biomarkatzaile gisa izan dezaketen interesa azpimarratu dute. Hala, hanturaren biomarkatzaile orokorra den C proteina erreaktiboaren mailak (CRP, *C reactive protein*) gora egiten du AEA pazienteen serumean, eta hori gaixotasunaren progresioaren bizkortzearekin erlazionatzen da. Gainera, CRP proteinak hesi hematoentzefalikoaren iragazkortasuna handitzen duela ikusi da, eta, horren ondorioz, mikrogliaen aktibazioa, zitozina proinflamatorioen askapena eta neuroinflamazioa gertatzen dela [20, 35]. Izan ere, sortzetiko immunologia-sistemak AEA goiztiarra detektatzen du, eta mikroglia, T zelulak, zelula dendritikoak eta antigenoen aurkezleak aktibatzen ditu traktu kortikoespinaletan eta kortex motorrean. Halaber, erantzun horrek hantura-markatzaileen askapena dakar [20, 36]. AEA esporadikoa pairatzen zuten pazienteen plasma-laginetan berriki egindako ikerlan batean, AEAREN patologia neuromuskularrak, T zelulen bitarteko erantzun immunitarioa aktibatuz, hantura-markatzaileen erregulazio sistemikoa dakarrela ikusi da. Hala, kreatina kinasa (CK, *creatine kinase*), ferritina, minbizi-nekrosi α faktorea (TNF- α , *tumor necrosis factor α*) eta hainbat interleuzinen mailak AEA pazienteen plasma-laginetan areagotzen direla ikusi zuten [37]. Gora erregulatutako zitozinen artean, interleuzina 6 (IL-6) eta TNF- α izan ziren plasman gehien igo zirenak. Ferritina eta IL-2 maila altuak biziraupen txarraren prediktiboak ziren. Bestalde, korrelazio positiboak atzeman zituzten hainbat markatzailearen artean. Esaterako, IL-5 eta CK artean, eta TNF- α eta NF-L artean. Baita ere, IL-6 interleuzina eta CRPren mailak sendo lotuta zeuden, eta horiek izan ziren gora egiten jarraitu zuten biomarkatzaile bakarrak gaixotasunak aurrera egin ahala. Ikerlanaren autoreen arabera, hantura-biomarkatzaileen pronostiko-balioan oinarritutako estratifikazioa interes handikoa izan liteke entsegu klinikoen diseinua hobetzeko. AEA pazienteen atzerabegirako kohorte batean egindako ikerlan batean [35], kreatinina eta albumina serikoaren maila baxuagoak, bai eta CRP eta glukosaren maila altuagoak ere (AEA diagnostikatu zen unean neurtuta), hiltzeko arrisku handiagoarekin lotu zituen. Halaber, kreatinina eta albumina mailen jaitsiera eta CRP eta glukosaren mailen igoera (AEA diagnostikoaren ondoren) pronostiko txarraren adierazle ziren. Egileen arabera, mereziko luke biomarkatzaile horiei buruzko azterketa gehiago egitea, horien analisisia erraza eta kostu txikikoa baita [35].

Makrofagoek askatutako kitinasak eta kitinasa antzeko proteinak ere AEAREN biomarkatzaile gisa proposatu dira. AEA pazienteetan, hiru dira gehien handitzen diren kitinasak, kitotriosidasa 1 (CHIT1, *chitotriosidase-1*), kitinasa-3-ren antzeko proteina 1 (CHI3L1, *chitinase-3-like protein 1*) eta kitinasa-3-ren antzeko proteina 2 (CHI3L2, *chitinase-3-like protein 2*), eta hirurak askatzen dituzte aktibatutako makrofagoek. Kitina

du ten patogenoen aurkako erantzunean, CHIT1-en kitinasa aktibitateak kitina-zatiak sortzen ditu, eta horiek *Toll-Like* (TLR) familiako hartzaileen bitarteko zitozinen (TNF- α , IL-17 eta/edo IL-10) askatzea eragiten dute [38, 39]. CHIT1-ek AEAn duen papera ondo ezagutzen ez bada ere, *in vitro* aktibatutako mikroglia CHT1 askatzen du, eta AEA pazienteen bizkarmuineko mikroglia CHT1 espresatzen da. CHI3L1 eta CHI3L2 proteinek ez dute kitinasa aktibitatearik, baina funtzio ugari dituzte erantzun immunean eta ehun-birmoldaketan, makrofagoen eta astroglia zelulen migrazioa barne. CHI3L1-en eta CHI3L2-en adierazpena altua da AEA pazienteen kortex motorrean eta bizkarmuinean, eta, nerbio-sistema zentralean makrofagorik ugariena den aldetik, mikroglia omen da horren erantzulea [40]. Izan ere, AEAn mikroglia aktibazioa eta proliferazioa gertatzen da. Kitinasak eta kitinasa antzeko proteinen mailen azterketak AEA eta alboko esklerosi primarioa bereizteko baliozkoak izan litezkeela proposatu da, bi gaixotasun horietan mikroglia erantzuna desberdina delako. Izan ere, CHIT1-en, CHI3L1-en zein CHI3L2-ren mailak areagotzen dira AEAn, baina soilik CHI3L1 alboko esklerosi primarioan [41].

Zitozinen mailekin batera aztertuta, mikroRNA batzuen mailak ere hanturaren adierazle gisa proposatu dira [42]. Esaterako, miR-541 (mikroglia-aktibazioaren inhibitzailea) AEA gaixoen leukozitoetan murriztuta dagoela ikusi da, eta, aldi berean, glia zelulek eta neuronek jariatutako CCL2 kimiozina (CCL2, *chemokine (C-C motif) ligand 2*) proinflatatorioa handituta dago serumean zein plasman. Beraz, miR-451-ren eta CCL2-ren azterketak zelula inflamatorioen errekrutatze eta aktibazioari buruzko informazioa eman lezake. Horrekin batera, miR-206 eta miR-338-3p gora erregulatuta daude leukozitoetan, eta miR-206-ren kasuan, serum-laginetan eta plasma-laginetan ere bai. miR-206 muskulu eskeletikoaren hazkunderako eta birsorkuntzarako funtsezkoa da, eta miR-338-3p lotura neuromuskularren erregulatzailea da. Beraz, miR-206 eta miR-338-3p muskulu eskeletikoaren osasun-egoera aztertzeke biomarkatzaile baliagarriak izan litezke [13].

4.5. Biomarkatzaile metabolikoak

SOD1 genearen mutazioa du ten AEAnko pazienteen neurona motoretan metabolismo glikolitikoaren asaldurak atzeman dira [43]. Hala ere, SOD1G93A mutazioa daramaten neurona ereduetan, glikolisi aerobikoaren gorako erregulazio bat atzematen da, pirubato deshidrogenasa kinasa 1 proteinaren espresio altuagoarekin erlazionatuta dagoena. Badi rudi asaldura horiek estres zelularrekiko sentikortasuna handiagotzen dutela [44]. Interesgarria oso, AEA du ten pazienteen LZRN eta plasman pirubato eta glukosaren kontzentrazioak handituta daude [43]. Are gehiago, alterazio horien magnitudeek eta biziraupen-denborak alderantzizko korrelazioa dute.

AEA pazienteetan metabolismo lipidikoaren asaldurak ere agertzen dira, hipolipidemia ohikoa izanik. Badirudi asaldura metaboliko horrek ez duela osagai genetikorik, baizik eta gaixotasunaren patofisiologiaren ondorioa da. Hala, azpimarratzekoa da hipolipidemia SOD1G93A saguen etapa presintomatikoaren ezaugarria dela [45], eta gantzetan aberastutako dietak biziraupena % 20 hedatzen duela. Halaber, AEA pazienteen kolesterol osoaren, triglizeridoen, LDL lipoproteinen eta LDL/HDL erlazioaren azterketaren bidez, gaixotasun horretan hipolipidemia ohikoa dela ikusi da, eta, SOD1G93A sagu-ereduan ikusitakoaren ildotik, ikerketa batzuek erakutsi dute triglizeridoen eta kolesterolaren maila serikoak AEA pazienteen biziraupen handiagoarekin lotzen direla. Beraz, gaixotasun kardiobaskularretan ez bezala, proposatu da AEAREN gaixotasunean dislipidemia babes-faktorea izan daitekeela, eta, beraz, pronostiko markatzaile gisa erabil zitekeen [11, 13, 37].

4.6. Beste biomarkatzaile posible batzuk

Nahasmendu neurodegeneratibo asko larruazaleko aldaketekin batera gertatzen dira. AEA pazienteetan gaizki tolestutako TDP-43 proteina larruazaleko zelula epidermikoetan agertzen da, baina horren arrazoia ez da ezagutzen. Baliteke TDP-43 neuronetatik zelula epidermikoetara hedatzea prioiek erabiltzen duten antzeko mekanismo baten bidez. Hala ere, azalaren arkitekturan gertatzen diren aldaketak ezin dira soilik AEAREkin lotu; beraz, une honetan ez dute diagnostiko ahalmenik [11].

Gernuan aurki daitezkeen AEAREN biomarkatzaileen artean p75ECD neurotrofinaren hartzailea gehien aztertuenetakoa da. Bere kontzentrazioa nabarmen altuagoa da AEA duten pazienteen gernuan, beste gaixotasun neurologiko edo paziente osasuntsuekin alderatuta [46]. Garrantzitsua da azpimarratzea, p75ECD SOD1G93A saguen gernuan detekta daitekeela AEAREN sintomak agertu baino 40 egun lehenago. AEA asintomatikoa pairatzen duten pazienteen gernuan ere p75ECD kontzentrazioak handituta dauden aztertzea interesgarria litzateke [11].

Laburbilduz, asko dira animalia ereduetan zein giza laginetan aztertu diren biomarkatzaileak AEA gaixotasunaren diagnostikorako. Hala ere, ez da behin betiko markatzailearik eskaini, eta ikerketa gehiago behar direla ikusi da gaixotasunaren progresioa aztertzeko eta diagnostiko goiztiarra ezartzeko.

ESKER ONAK

Egileek, Zientzia eta Berrikuntza Ministerioaren (PID2022-138266NB-I00; IG-B eta GGdG) eta Eusko Jaurlaritzaren (IT1620-22; IG-B eta GGdG) dirulaguntzak jaso dituzte. Miquel Saumell-Esnaola IT1620-22 proiektuak finantzatutako doktorego ondoko kontratu baten onuraduna da.

BIBLIOGRAFIA

- [1] CHIÒ, A., LOGROSCINO, G., TRAYNOR, B. J., COLLINS, J., SIMEONE, J. C., GOLDSTEIN, L. A., WHITE, L. A. 2013. «Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature». *Neuroepidemiology*, **41**, 118-130.
- [2] GOIS, A. M., MENDONÇA, D. M. F., FREIRE, M. A. M., SANTOS, J. R. 2020. «In Vitro and In Vivo Models OF Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Updated Overview». *Brain Research Bulletin*, **159**, 32-43.
- [3] AKTEKIN, M. R., UYSAL, H. 2020. «Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis». *Turkish Journal Of Neurology*, **26**, 187-196.
- [4] RICCI, C., MARZOCCHI, C., BATTISTINI, S. 2018. «MicroRNAs as Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis». *Cells*, **7**, 219.
- [5] MAZÓN, M., VÁZQUEZ COSTA, J. F., TEN-ESTEVE, A., MARTÍ-BONMATÍ, L. 2018. «Imaging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Neurodegenerative Diseases. The Example of Amyotrophic Lateral Sclerosis». *Frontiers in Neuroscience*, **12**, 1-19.
- [6] TAYLOR, J. P., BROWN, R. H., CLEVELAND, D. W. 2016. «Decoding ALS: from genes to mechanism». *Nature*, **539**, 197-206.
- [7] COURATIER, P., CORCIA, P., LAUTRETTE, G., NICOL, M., PREUX, P.-M., MARIN, B. 2016. «Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature». *Revue Neurologique*, **172**, 37-45.
- [8] VAN ES, M. A., HARDIMAN, O., CHIO, A., AL-CHALABI, A., PASTERKAMP, R. J., VELDINK, J. H., VAN DEN BERG, L. H. 2017. «Amyotrophic lateral sclerosis». *The Lancet*, **390**, 2084-2098.
- [9] BUCHELI, M. E., CAMPOS, M., BERMUDEZ, D. B., CHUQUIMARCA, J. P., SAMBACHE, K., CHEVERREZ, K., NIATO, J. F., MONTALVO, J., ANDINO, A., CALLERO, C., GUERRERO, P. 2012. «Esclerosis lateral amiotrófica: criterios de El Escorial y la electromiografía en su temprano diagnóstico». *Revista Ecuatoriana de Neurología*, **21**, 61-68.
- [10] HARDIMAN, O., AL-CHALABI, A., CHIO, A., CORR, E. M., LOGROSCINO, G., ROBBERECHT, W., SHAW, P. J., SIMMONS, Z., VAN DEN BERG, L. H. 2017. «Amyotrophic lateral sclerosis». *Nature Reviews Disease Primers*, **3**, 17071.
- [11] PAMPALAKIS, G., MITROPOULOS, K., XIROMERISIOU, G., DARDIOTIS, E., DERETZI, G., ANAGNOSTOULI, M., KATSILA, T., RENTZOS, M., PATRINOS, G. P. 2019. «New molecular diagnostic trends and biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis». *Human Mutation*, **40**, 361-373.
- [12] MEJZINI, R., FLYNN, L. L., PITOUT, I. L., FLETCHER, S., WILTON, S. D., AKKARI, P. A. 2019. «ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now?». *Frontiers in Neuroscience*, **13**, DOI: 10.3389/fnins.2019.01310.
- [13] VIJAYAKUMAR, U. G., MILLA, V., CYNTHIA STAFFORD, M. Y., BJORNSON, A. J., DUDDY, W., DUGUEZ, S. M.-R. 2019. «A Systematic Review of

- Suggested Molecular Strata, Biomarkers and Their Tissue Sources in ALS». *Frontiers in Neurology*, **10**, DOI: 10.3389/fneur.2019.00400.
- [14] OSKARSSON, B., GENDRON, T. F., STAFF, N. P. 2018. «Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018». *Mayo Clinic Proceedings*, **93**, 1617-1628.
- [15] CHO, H., SHUKLA, S. 2020. «Role of Edaravone as a Treatment Option for Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis». *Pharmaceuticals*, **14**, 29.
- [16] LASLO, P., LIPSKI, J., NICHOLSON, L. F. B., MILES, G. B., FUNK, G. D. 2001. «GluR2 AMPA Receptor Subunit Expression in Motoneurons at Low and High Risk for Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis». *Experimental Neurology*, **169**, 461-471.
- [17] HOLLMANN, M., HARTLEY, M., HEINEMANN, S. 1991. «Ca²⁺ Permeability of KA-AMPA—Gated Glutamate Receptor Channels Depends on Subunit Composition». *Science*, **252**, 851-853.
- [18] KWAK, S., KAWAHARA, Y. 2005. «Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis». *Journal of Molecular Medicine*, **83**, 110-120.
- [19] LEE, Y., MORRISON, B. M., LI, Y., LENGACHER, S., FARAH, M. H., HOFFMAN, P. N., LIU, Y., TSINGALIA, A., JIN, L., ZHANG, P.-W., PELLERIN, L., MAGISTRETTI, P. J., ROTHSTEIN, J. D. 2012. «Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration». *Nature*, **487**, 443-448.
- [20] HUANG, F., ZHU, Y., HSIAO-NAKAMOTO, J., TANG, X., DUGAS, J. C., MOSCOVITCH-LOPATIN, M., GLASS, J. D., BROWN, R. H., LADHA, S. S., LACOMIS, D., HARRIS, J. M., SCEARCE-LEVIE, K., HO, C., BOWSER, R., BERRY, J. D. 2020. «Longitudinal biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis». *Annals of Clinical and Translational Neurology*, **7**, 1103-1116.
- [21] AL-CHALABI, A., HARDIMAN, O., KIERNAN, M. C., CHIÒ, A., RIX-BROOKS, B., VAN DEN BERG, L. H. 2016. «Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system». *The Lancet Neurology*, **15**, 1182-1194.
- [22] AGOSTA, F., SPINELLI, E. G., FILIPPI, M. 2018. «Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: current and emerging uses». *Expert Review of Neurotherapeutics*, **18**, 395-406.
- [23] HÄKKINEN, S., CHU, S. A., LEE, S. E. 2020. «Neuroimaging in genetic frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis». *Neurobiology of Disease*, **145**, 105063.
- [24] KIERNAN, M. C., VUCIC, S., CHEAH, B. C., TURNER, M. R., EISEN, A., HARDIMAN, O., BURRELL, J. R., ZOING, M. C. 2011. «Amyotrophic lateral sclerosis». *The Lancet*, **377**, 942-955.
- [25] HAYDEN, C. D., MURPHY, B. P., HARDIMAN, O., MURRAY, D. 2022. «Measurement of upper limb function in ALS: a structured review of current methods and future directions.». *Journal of neurology*, **269**, 4089-4101.
- [26] GRAD, L. I., ROULEAU, G. A., RAVITS, J., CASHMAN, N. R. 2017. «Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **7**, a024117.

- [27] VIGNAROLI, F., MELE, A., TONDO, G., DE GIORGIS, V., MANFREDI, M., COMI, C., MAZZINI, L., DE MARCHI, F. 2023. «The Need for Biomarkers in the ALS-FTD Spectrum: A Clinical Point of View on the Role of Proteomics». *Proteomes*, **11**, 1.
- [28] SCOTTER, E. L., CHEN, H.-J., SHAW, C. E. 2015. «TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets». *Neurotherapeutics*, **12**, 352-363.
- [29] MAJUMDER, V., GREGORY, J. M., BARRIA, M. A., GREEN, A., PAL, S. 2018. «TDP-43 as a potential biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis». *BMC Neurology*, **18**, 90.
- [30] STURMEY, E., MALASPINA, A. 2022. «Blood biomarkers in ALS: challenges, applications and novel frontiers». *Acta neurologica Scandinavica*, **146**, 375-388.
- [31] WOBST, H. J., MACK, K. L., BROWN, D. G., BRANDON, N. J., SHORTER, J. 2020. «The clinical trial landscape in amyotrophic lateral sclerosis—Past, present, and future». *Medicinal Research Reviews*, **40**, 1352-1384.
- [32] FLOETER, M. K., GENDRON, T. F. 2018. «Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Associated With Hexanucleotide Expansion Mutations in C9orf72». *Frontiers in Neurology*, **9**, DOI: 10.3389/fneur.2018.01063.
- [33] THOMPSON, A. G., GRAY, E., THÉZÉNAS, M.-L., CHARLES, P. D., EVETTS, S., HU, M. T., TALBOT, K., FISCHER, R., KESSLER, B. M., TURNER, M. R. 2018. «Cerebrospinal fluid macrophage biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis». *Annals of Neurology*, **83**, 258-268.
- [34] LI, R., WANG, J., XIE, W., LIU, J., WANG, C. 2020. «UCHL1 from serum and CSF is a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis». *Annals of Clinical and Translational Neurology*, **7**, 1420-1428.
- [35] SUN, J., CARRERO, J. J., ZAGAI, U., EVANS, M., INGRE, C., PAWITAN, Y., FANG, F. 2020. «Blood biomarkers and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis». *European Journal of Neurology*, **27**, 2125-2133.
- [36] BLASCO, H., GARCON, G., PATIN, F., VEYRAT-DUREBEX, C., BOYER, J., DEVOS, D., VOURC'H, P., ANDRES, C. R., CORCIA, P. 2017. «Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study». *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*, **44**, 90-95.
- [37] LU, C.-H., ALLEN, K., OEI, F., LEONI, E., KUHLE, J., TREE, T., FRATTA, P., SHARMA, N., SIDLE, K., HOWARD, R., ORRELL, R., FISH, M., GREENSMITH, L., PEARCE, N., GALLO, V., MALASPINA, A. 2016. «Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis». *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, **3**, e244.
- [38] SILVA, C. A. DA, HARTL, D., LIU, W., LEE, C. G., ELIAS, J. A. 2008. «TLR-2 and IL-17A in Chitin-Induced Macrophage Activation and Acute Inflammation». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **181**, 4279.

- [39] DA SILVA, C. A., CHALOUNI, C., WILLIAMS, A., HARTL, D., LEE, C. G., ELIAS, J. A. 2009. «Chitin Is a Size-Dependent Regulator of Macrophage TNF and IL-10 Production». *The Journal of Immunology*, **182**, 3573-3582.
- [40] SANFILIPPO, C., LONGO, A., LAZZARA, F., CAMBRIA, D., DISTEFANO, G., PALUMBO, M., CANTARELLA, A., MALAGUARNERA, L., DI ROSA, M. 2017. «CHI3L1 and CHI3L2 overexpression in motor cortex and spinal cord of sALS patients». *Molecular and cellular neurosciences*, **85**, 162-169.
- [41] GAUR, N., PERNER, C., WITTE, O. W., GROSSKREUTZ, J. 2020. «The Chitinas as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Signals From the CNS and Beyond». *Frontiers in Neurology*, **11**, 377.
- [42] LIU, H., LAN, S., SHI, X.-J., FAN, F.-C., LIU, Q.-S., CONG, L., CHENG, Y. 2023. «Systematic review and meta-analysis on microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis». *Brain Research Bulletin*, **194**, 82-89.
- [43] FUNALOT, B., DESPORT, J.-C., STURTZ, F., CAMU, W., COURATIER, P. 2009. «High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis». *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, **10**, 113-117.
- [44] VALBUENA, G. N., RIZZARDINI, M., CIMINI, S., SISKOS, A. P., BENDOTTI, C., CANTONI, L., KEUN, H. C. 2016. «Metabolomic Analysis Reveals Increased Aerobic Glycolysis and Amino Acid Deficit in a Cellular Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis». *Molecular Neurobiology*, **53**, 2222-2240.
- [45] HIGGINS, C. M. J., JUNG, C., XU, Z. 2003. «ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes». *BMC neuroscience*, **4**, 16.
- [46] SHEPHEARD, S. R., WUU, J., CARDOSO, M., WIKLENDT, L., DINNING, P. G., CHATAWAY, T., SCHULTZ, D., BENATAR, M., ROGERS, M.-L. 2017. «Urinary p75ECD: A prognostic, disease progression, and pharmacodynamic biomarker in ALS». *Neurology*, **88**, 1137-1143.