



www.neurobiomarcadores.com

MÓDULO 4

Biomarcadores en la esclerosis lateral amiotrófica

Lección 3 Laboratorio

Dr. Daniel Borrego Hernández

Laboratorio de Investigación en Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), Unidad de ELA,
Servicio de Neurología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

1. Estudios de diagnóstico

A pesar de que el diagnóstico de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) sigue siendo eminentemente clínico y que no existe ninguna prueba de laboratorio que mejore en precisión ni rapidez este diagnóstico, sí que es muy útil realizar algunas pruebas tanto para un posible diagnóstico diferencial en la evolución del paciente como para realizar un consejo genético familiar adecuado.

1.1. Genética

El panorama genético en la enfermedad de la ELA se ha ido ampliando a medida que se han mejorado las técnicas de secuenciación y, a su vez, se ha ligado a otras enfermedades neurodegenerativas como la demencia frontotemporal (DFT).

Aunque la identificación de *SOD1* como primer gen ligado inicialmente a la ELA familiar fue en 1991 ⁽¹⁾, el descubrimiento de nuevos genes asociados ha sido paulatino hasta la actualidad.

Los genes más relevantes en la ELA por número de casos implicados son *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP* y *FUS*. La suma de estos 4 genes representa aproximadamente el 60% de las ELA familiares (ELAf) y el 15% de los casos de ELA esporádica (ELAe), mientras que las mutaciones en otros genes se encuentran en menos o igual al 1% de los pacientes ^{(2) (3)} **(Figura 1)**.

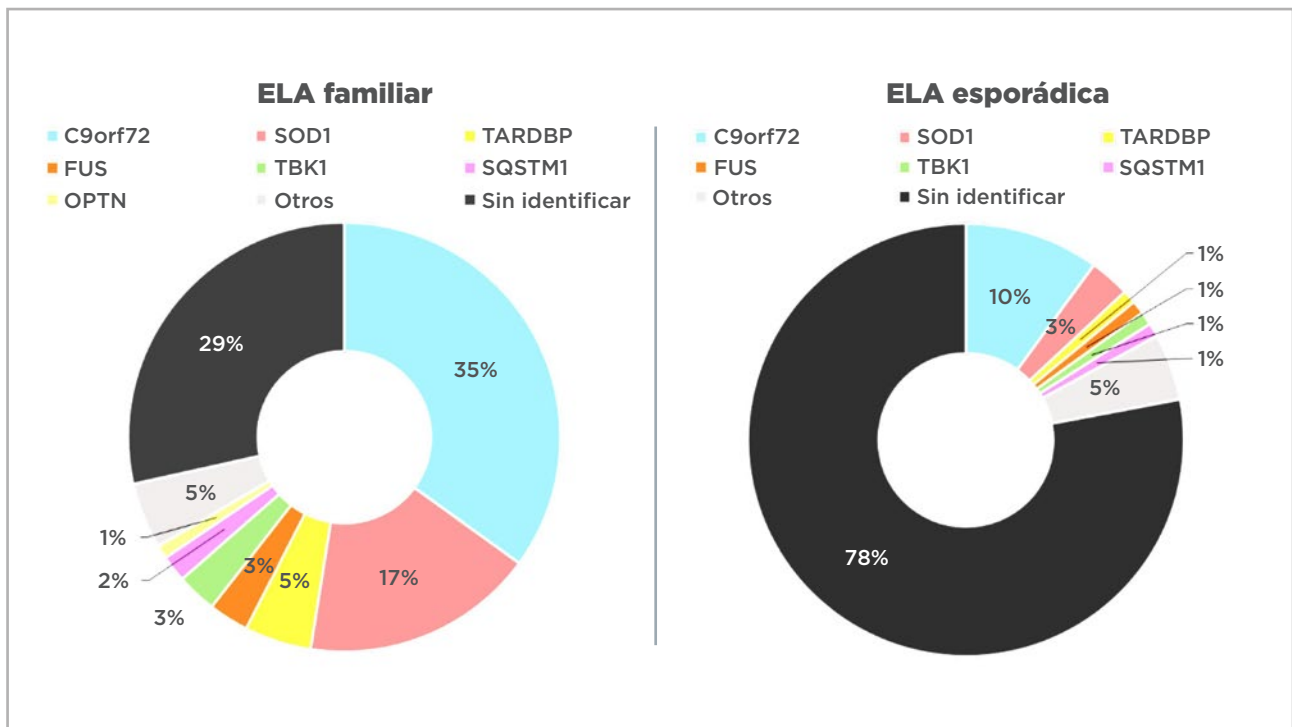


Figura 1. Porcentaje de contribución de los genes principales en los casos de esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELAf) y ELA esporádica (ELAe), así como el porcentaje de casos sin causa genética conocida.

Es importante indicar que solamente entre el 5 y el 10% de los casos de ELA tienen un componente hereditario (ELAf), mientras que el resto se consideran casos de ELAe.

- **SOD1.** Como se ha comentado anteriormente, el primer gen identificado en esta patología fue *SOD1*, describiéndose 11 mutaciones en 1993⁽⁴⁾. El gen *SOD1* codifica por la superóxido dismutasa de Cu/Zn, una enzima citoplasmática cuya función es la transformación de los radicales superóxido.

En la actualidad se han descrito más de 180 mutaciones en este gen. La mayoría de los cambios afectan a residuos de *SOD1* que están altamente conservados filogenéticamente⁽⁵⁾, lo que sugiere que esos sitios son importantes para la función de *SOD1*.

La mayoría de las mutaciones muestran un patrón de herencia autosómica dominante con alta penetrancia. Una excepción notable es la que representa la variante p.D90A (p.D91A en el actual sistema de numeración), la cual

presenta herencia recesiva en la población escandinava pero dominante en el resto del mundo⁽⁶⁾. También se han descrito variantes, como la p.G16S, con asociación a formas juveniles⁽⁷⁾. La razón de por qué una mutación en *SOD1* puede ser selectivamente dañina en neuronas motoras es aún desconocida, dado que este gen está ampliamente expresado y conservado⁽⁸⁾.

- **TARDBP.** En 2006, se identificó la proteína TAR de unión a ADN de 43 kDa (TDP-43) como el componente principal en las inclusiones citoplasmáticas ubiquitinadas en la ELA y como la característica neuropatológica más importante de la enfermedad⁽⁹⁾. Tras este descubrimiento, las mutaciones en el gen *TARDBP* (que codifica para TDP-43) se relacionaron con casos de ELAf y ELAe^{(10) (11)}.

Se han descrito más de 50 mutaciones diferentes, casi todas las variantes son de cambio de aminoácido (*missense*), mostrando un patrón de herencia autosómico dominante.

- **FUS.** Las mutaciones en *FUS* se identificaron tras un estudio de ligamiento que indicó la región genómica 16q11.2. Posteriormente, gracias al hallazgo de *TARDBP* como causa genética de la enfermedad, se estudió *FUS* por las similitudes estructurales de las proteínas por las que codifican estos genes, describiéndose 14 mutaciones en 17 familias de origen británico y americano^{(12) (13)}.

La gran mayoría de las mutaciones son sustituciones de aminoácidos, autosómicas dominantes y se encuentran en el exón 15, que codifica el extremo C-terminal de la proteína, y el resto son mutaciones que cambian el marco de lectura (*frameshift*) o de terminación temprana de la traducción (*nonsense*).

Las mutaciones *de novo* de *FUS*, como es el caso de la p.P525L, también son responsables de una parte de los casos esporádicos y juveniles de ELA⁽¹⁴⁾.

- **C9ORF72.** En 2011, la realización de un GWAS (*genome-wide association studies*) de pacientes fineses con ELA identificó un locus en el cromosoma 9p21, que estaba presente en más del 40% de los casos de ELAf y en aproximadamente el 25% de todos los casos de ELA^{(15) (16)}. Estudios posteriores identificaron el haplotipo finés en otras poblaciones europeas

⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾ y determinaron que surgió de una sola mutación fundadora ⁽¹⁶⁾. La causa del resultado del GWAS fue identificada como una expansión de una repetición (ER) de hexanucleótidos localizada entre los primeros exones no codificantes (denominados 1a y 1b) ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾.

En estudios posteriores, la frecuencia de la expansión fue evaluada en 17 regiones alrededor del mundo, incluyendo países europeos, diferentes poblaciones étnicas en Estados Unidos, en países asiáticos, Australia, en el Medio Oriente y en las islas del Pacífico ⁽²¹⁾. Además, todos los pacientes con la expansión también tenían el haplotipo fundador finés rs3849942 ⁽²²⁾. La frecuencia más alta de la mutación es en Finlandia (21%) y sigue un gradiente de norte a sur (**Tablas 1 y 2**). Se estimó que la mutación ocurrió aproximadamente hace 1.500 años, unas 100 generaciones en Finlandia, 80 en Alemania y 60 en Italia ⁽²¹⁾.

País	Finlandia	Reino Unido	Irlanda	Holanda	Alemania	Francia	Italia	España	Grecia
ELAf	46	46	41	47	22	46	38	27	50
ELAe	21	7	5	5	5	8	4	3	8

Datos extraídos de Majounie *et al.*, 2012 [21]

Tabla 1. Gradiente norte-sur de *C9orf72* en esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Porcentaje de casos causados por la expansión de *C9orf72* en ELA familiar (ELAf) y ELA esporádica (ELAe) en distintos países de Europa.

País	Finlandia	Reino Unido	Irlanda	Holanda	Alemania	Francia	Italia	España	Grecia
DFTf	48	57	17	26	17	10	44	6	30
DFTe	19	12	6	2	4	4	10	6	3

Datos extraídos de Van der Zee *et al.*, 2012 [21]

Tabla 2. Gradiente norte-sur de *C9orf72* en demencia frontotemporal (DFT). Porcentaje de casos causados por la expansión de *C9orf72* en DFT familiar (DFTf) y DFT esporádica (DFTe) en distintos países de Europa.

El número de repeticiones en los individuos sanos suele ser de 2 a 10, habiéndose descrito expansiones de hasta 23 repeticiones en controles sanos, mientras que los pacientes con ELA o DFT asociados a esta variante tienen entre 30 y varios cientos de repeticiones ^{(19) (20)}. Sin embargo, se ha identificado un número de repeticiones intermedias, de 20 a 30, tanto en pacientes como en controles ^{(23) (24)} de difícil caracterización sobre todo de cara al consejo genético.

Otros análisis realizados en pacientes de ELA y de DFT (esporádicos y familiares) utilizando la técnica de la triple PCR demostraron que esta ER de hexanucleótidos es la causa más frecuente de ELA y DFT ^{(25) (26)}.

El fenotipo clínico asociado con estas expansiones se caracteriza principalmente por síntomas de DFT y signos de enfermedad de las neuronas motoras. La presentación clínica también se extiende a casos con rasgos de ELA, cuerpos de Lewy diagnosticados inicialmente como ELA o demencia con cuerpos de Lewy, e incluso se ha descrito en una fenocopia de la enfermedad de Huntington ^{(27) (28)}.

1.1.1. Triple PCR

En el caso del estudio de la presencia de la ER del hexanucleótido GGGGCC en el intrón 1 del gen *C9orf72*, se lleva a cabo una triple PCR o *repeat-primed PCR*. El método de la triple PCR es un sistema rápido y preciso de separar las muestras que portan la expansión patogénica de la repetición (≥ 30 repeticiones) de los que portan el alelo de referencia (≤ 20 repeticiones). Este ensayo de PCR utiliza un cebador flanqueante específico marcado con fluorescencia (P1) junto con un par de cebadores (P2, P3), que comparten una secuencia 5' común (cola). Los criterios de selección para la secuencia del cebador de anclaje (P2) son que debe contener poca o ninguna complementariedad consigo mismo, no tener complementariedad (GCA)5', (TGC)5' o (GGGGCC)5', y no tener homología con secuencias humanas conocidas. El cebador reverso (P3) tiene la secuencia (GGGGCC)5' en su extremo 3' en función de la hebra de la repetición a amplificar **(Tabla 3)**.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
Cebador con fluorescencia (P1)	6FAM-TGTAACGACGGCCAGTCAAGGAGGGAAACAACCGCAGCC
Cebador de anclaje (P2)	CAGGAAACAGCTATGACCGGGCCCGCCCGACCGCCCCGGCCCCGGCCCCGG
Cebador reverso (P3)	CAGGAAACAGCTATGACC

De Jesús-Hernández et al., 2011 [20]

Tabla 3. Secuencia de los cebadores empleados en la triple PCR.

1.1.2. Secuenciación Sanger

La metodología realizada para la secuenciación Sanger ⁽²⁹⁾ consta de 7 etapas diferenciadas: a) realización de la PCR del fragmento deseado; b) electroforesis en gel de agarosa para comprobar si la PCR ha sido efectiva específicamente en nuestro fragmento deseado; c) purificación y cuantificación del producto de PCR; d) realización de la reacción de secuenciación; e) precipitación del producto de la reacción de secuenciación; f) electroforesis capilar; y g) análisis del electroferograma.

Los resultados de las secuencias obtenidas de los pacientes se comparan con las secuencias de referencia proporcionadas por las bases de datos internacionales como Ensembl Genome Browser o el Gen-Bank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Este protocolo de secuenciación Sanger se aplica para el análisis de los genes tradicionalmente ligados a la ELA y la DFT, como son *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *MAPT*, *GRN*, *VCP* y *SETX*. También se utiliza para confirmar las variantes potencialmente patogénicas encontradas por secuenciación masiva (*next generation sequencing* -NGS-) en los pacientes, así como para comprobar la posible cosegregación de la variante en los casos de los que se disponga de ADN procedente de otros miembros de la familia. Por último, en caso de obtener una baja cobertura para algún exón mediante alguna de las técnicas de secuenciación masiva aplicadas para cualquiera de los pacientes, también se procede de igual manera.

1.1.3. NGS

Hasta hace unos años, la primera aproximación de NGS utilizada era la secuenciación masiva dirigida a través del diseño y la puesta a punto de un panel génico que permite una secuenciación costo-efectiva de una batería amplia de genes relacionados con la ELA y la DFT (un ejemplo de los genes elegidos hace unos años se puede ver en la **Tabla 4**).

<i>ALS2</i>	<i>ANG</i>	<i>ANXA11</i>	<i>AR</i>	<i>ATRNL</i>	<i>ATXN2</i>	<i>C9orf72</i>
<i>CCNF</i>	<i>CHCHD10</i>	<i>CHGB</i>	<i>CHMP2B</i>	<i>DAO</i>	<i>DCTN1</i>	<i>EPB41L1</i>
<i>EPHA4</i>	<i>EWSR1</i>	<i>FIG4</i>	<i>FLNC</i>	<i>FUS</i>	<i>GRN</i>	<i>HNRNPA1</i>
<i>HNRNPA2B1</i>	<i>KIF5A</i>	<i>MAPT</i>	<i>MATR3</i>	<i>NEFH</i>	<i>NEK1</i>	<i>OPTN</i>
<i>PFN1</i>	<i>PRPH</i>	<i>PSEN1</i>	<i>SETX</i>	<i>SIGMAR1</i>	<i>SOD1</i>	<i>SPAST</i>
<i>SPG11</i>	<i>SPG7</i>	<i>SQSTM1</i>	<i>STX12</i>	<i>TAF15</i>	<i>TARDBP</i>	<i>TBK1</i>
<i>TUBA4A</i>	<i>UBQLN2</i>	<i>UNC13A</i>	<i>VAPB</i>	<i>VCP</i>	<i>VEGFA</i>	

Tabla 4. Genes seleccionados para el diseño del panel génico personalizado.

Las dos tecnologías más utilizadas en panel génico han sido la tecnología basada en amplicones llamada TruSeq Custom Amplicon® (TSCA, Illumina) y la considerada como *gold standard* SureSelect® (Agilent). La cobertura media debe ser de 300 X para asegurarnos una cobertura mínima media de 100 X y que tenga una fiabilidad clínica aceptable. Cuando se diseña un panel génico es importante asegurarse de cubrir todas las regiones codificantes de los exones, las regiones UTR (5' y 3') y además incluir sitios de flanqueamiento intrónico de 25 pb con el fin de cubrir zonas de corte y empalme del ARN (*splicing*) adyacentes. Además, también es importante evitar polimorfismos en el diseño de los cebadores.

La plataforma de secuenciación más común para un panel génico es MiSeq® (Illumina), que dispone del software MiSeq Reporter® (Illumina) que puede hacer un primer análisis de los datos crudos de secuenciación.

Actualmente, la aproximación de NGS más utilizada y considerada más costo-efectiva es la secuenciación del exoma, también conocida por sus siglas en inglés WES (*whole exome sequencing*). En este caso, se trata de la secuenciación de todas las secuencias codificantes del genoma, así como las regiones UTR (5' y

3') y regiones de flanqueamiento para asegurar la inclusión de posibles zonas genómicas que contengan sitios de *splicing*.

Los archivos brutos de secuenciación (FASTQ y BAM) se alinean contra el genoma de referencia humana GRCh38/Hg18 (anteriormente GRCh37/Hg19). Por último, los archivos VCF, que poseen la información de todas las bases que no son iguales a las del genoma de referencia, se anotan mediante distintos *softwares* como ANNOVAR⁽³⁰⁾.

Como datos de calidad de la secuenciación realizada por este método, es necesario comprobar que la calidad de lectura Q30 sea superior a 90 de media, así como comprobar que la cobertura mínima y media cumplen con los criterios de diseño. Pueden existir regiones más propensas a tener una cobertura inferior a la adecuada por la existencia de secuencias muy repetitivas o de secuencias con poliG, C, T o A.

Por último, es muy importante la forma de analizar el archivo que contiene todas las variantes y la información que se puede emplear para seleccionar la existencia de variantes de interés. Se dispone de multitud de herramientas como son los predictores de patogenicidad *in silico*, los datos de conservación en la escala filogenética de cada residuo, los predictores de variación en la estructura terciaria o cuaternaria de la proteína, la frecuencia poblacional genética y alélica en distintas subpoblaciones mundiales en distintas bases de datos poblacionales, etc.

La definición de todas las características necesarias para que una variante sea realmente interesante debe ser decidida por una persona con criterio y experiencia en el campo, y al conjunto de esta estrategia es a lo que se denomina *pipeline*.

Un ejemplo de *pipeline* real:

- Eliminar variantes con $MAF < 0,01$ en las bases de datos GnomAD, 1000Genomes y ExAC.
- Priorizar variantes en las regiones codificantes y de corte y empalme.
- Eliminar variantes sinónimas que no afectan al corte y empalme.
- Predicción *in silico* (PolyPhen2, SIFT, MutationTaster, M-CAP, CADD).
- Evaluar el fenotipo y el modo de herencia en los casos familiares.

En los casos en los que se encuentran variantes consideradas patogénicas o probablemente patogénicas, se procede a su validación mediante secuenciación Sanger y, además, en los casos en los que es posible disponer de muestras de otros miembros de la familia, se realiza un análisis de cosegregación.

La ventaja que ofrece la WES sobre el panel génico personalizado es que la cantidad de genes analizados es muy superior, además de la capacidad de reanálisis futuro ante un nuevo descubrimiento genético en la patología. A su vez, es importante indicar que una vez que se ha realizado la secuenciación del exoma completo se puede realizar una “panelización” de este para no incluir hallazgos de variantes accidentales que se salgan de la patología de estudio. Es decir, podemos analizar solamente los genes de interés real, así como genes de enfermedades miméticas o relacionadas. En el caso de un estudio de exoma completo de un paciente con ELA, lo más común es incluir una búsqueda de variantes en todos los genes que también puedan estar presentes en otras demencias, en la enfermedad de Alzheimer, en la enfermedad de Parkinson, en distintos tipos de paraparesias, Charcot-Marie-Tooth y atrofia muscular espinal.

Para que se pueda visualizar de manera más clara la diferencia en el número de genes empleados, se señalan en azul en la **Tabla 5** los genes que estaban incluidos en el panel génico.

Por el contrario, el mayor inconveniente de la utilización sistemática de la secuenciación exómica es la aparición de un número muy grande de variantes de significado incierto (*variant of uncertain significance* -VUS-).

AAAS	AARS	ABCD1	ADAR	ADCY5	AHNAK2	ALDH18A1	ALS2	AMPD2	ANG
ANO3	ANXA11	AP4B1	AP4E1	AP4M1	AP4S1	AP5Z1	APOE	APP	AR
ARL6IP1	ARRP21	ARSA	ARSI	ATL1	ATM	ATPI3A2	ATPIA1	ATPIA3	ATP7B
ATRN	ATSV	ATXN2	B4GALNT1	BAG3	BCAP31	BICD2	BSCL2	C12orf65	C19orf12
C21orf2	C9orf72	CACNA1B	CAPRIN1	CCNF	CCT5	CHCHD10	CHCHD2	CHGB	CHMP2B
CIZ1	COL6A3	CPT1C	CYP2U1	CYP7B1	DAO	DCAF17	DCAF8	DCTN1	DDC
DDHD1	DDHD2	DGAT2	DHTKD1	DNAJB2	DNAJC6	DNM2	DNMT1	DYNC1H1	EGR2
ELP3	ENTPD1	EPB41L1	EPHA4	ERBB4	ERLIN1	ERLIN2	EWSR1	EXOSC3	FA2H
FBXO38	FBXO7	FIG4	FLNC	FTL	FUS	GAN	GARS	GBA2	GCDH
GCH1	GDAPI	GGNBP2	GJA1	GJB3	GNAL	GPX3	GRN	GSN	HARS
HEXA	HINT1	HMSN5	HNRNPA1	HNRNPA2B1	HPCA	HSPB1	HSPB3	HSPB8	HSD1
HTRA2	HTT	IBA57	IFRD1	IGHMBP2	KCC3	KCNMA1	KCTD17	KDM5C	KIF1A
KIF1B	KIF1C	KIF5A	L1CAM	LMNA	LRRK2	LRSAM1	MAG	MAPT	MARS
MATR3	MCM3AP	MED25	MFN2	MME	MOBP	MORC2	MPV17	NAGLU	NEFH
NEFL	NEK1	NIPA1	NT5C2	OPTN	PANK2	PARK10	PARK11	PARK12	PARK2
PARK7	PFN1	PGAP1	PINK1	PLA2G6	PLP1	PNKD	PNKP	PNPLA6	POLG
PRKN	PRKRA	PRPN	PRPH	PRRT2	PSEN1	PSEN2	RAB3GAP2	RAB7A	RAB8A
REEP1	REEP2	RELN	RTN2	SACS	SARM1	SCFD1	SCO2	SCYL1	SETX
SGCE	SGPL1	SIGMAR1	SLC16A2	SLC19A3	SLC25A46	SLC2A1	SLC33A1	SLC5A7	SCL6A3
SCL9A8	SMN1	SMN2	SNCA	SOD1	SORT1	SPART	SPAST	SPG11	SPG21
SPG7	SPR	SPTLC1	SPTLC2	SPTLC3	SQSTM1	STX12	TAF1	TAF15	TARDBP
TBCK	TBK1	TECP2	TFG	TH	THAP1	TIMM8A	TMEM106B	TNIP1	TOR1A
TREM2	TRIM2	TRPV4	TUBA4A	TUBB3	TUBB4A	UBQLN2	UNC13A	USP8	VAMP1
VAPB	VCP	VEGFA	VPS13A	VPS35	VPS37A	WARS	WASHC5	ZFR	ZFYVE26
ZFYVE27									

Tabla 5. Genes seleccionados para el estudio de los pacientes a los que se les realiza secuenciación exómica.

2. Estudios de investigación

Como ya se ha visto en el punto anterior, hoy por hoy el diagnóstico empleado es únicamente clínico, lo que suele implicar un retraso diagnóstico en España de unos 12-14 meses de media desde el inicio de los síntomas del paciente.

2.1. Diferencia entre biomarcador diagnóstico y pronóstico

En el caso de la ELA es difícil conseguir un **biomarcador diagnóstico** que anticipe que un paciente va a sufrir esta enfermedad con antelación al diagnóstico clínico que es realizado por el facultativo. Sin embargo, más líneas de investigación van dirigidas a encontrar **biomarcadores pronósticos** que permitan anticipar cómo será la evolución de la enfermedad en el paciente. De hecho, dada la variabilidad en la evolución del paciente según la edad de inicio, la forma de inicio de los síntomas y si el paciente porta alguna variante genética de interés, sería un paso muy importante en la vida del paciente ⁽³¹⁾.

2.1.1. Neurofilamentos

Los neurofilamentos (Nf) son proteínas estructurales en neuronas y glía que han sido ampliamente estudiados en diferentes enfermedades neurológicas como biomarcadores prometedores. Los Nf son filamentos intermedios de tipo IV que componen específicamente el citoesqueleto axonal de las neuronas, dándoles soporte estructural. Están compuestos de heteropolímeros de diferentes subunidades, la cadena ligera de neurofilamento (NfL), la cadena media (NfM), la cadena pesada (NfH) y la α -internexina, que en el sistema nervioso periférico se reemplaza por la periferina. Los Nf se unen entre sí y proporcionan un puente cruzado con los filamentos de actina y las proteínas de microtúbulos. Tienen una función de soporte estructural, manteniendo el calibre neuronal con un diámetro de entre 8 y 12 nm. También son componentes integrales de la sinapsis, importantes para las transmisiones de las señales eléctricas neuronales a lo largo de los axones influyendo en la velocidad de conducción.

El ensamblaje anormal de Nf se puede observar en varias enfermedades neurodegenerativas incluida la ELA. La importancia de estas moléculas como biomarcadores radica en que cuando se produce daño axónico en los trastornos del sistema nervioso central (SNC), los Nf se liberan al líquido cefalorraquídeo (LCR) y luego drenan hasta la sangre a través de granulaciones aracnoideas. De este modo, los niveles de Nf encontrados en estos fluidos reflejan daño neuronal, siendo útiles como biomarcadores de lesión neuronal tanto aguda como crónica.

Durante la última década, múltiples estudios han investigado este potencial de los Nf, tanto en LCR como en sangre. Las subunidades de los neurofilamentos más estudiadas son la NfL y la cadena pesada fosforilada (pNfH) debido a su alta solubilidad. Ambas se correlacionan con el grado de degeneración de las neuronas motoras. Desde el punto de vista genético, se han asociado mutaciones en el dominio C-terminal del gen codificante de NfH, deleciones o inserciones, con la ELAe.

Por otro lado, se ha demostrado que los niveles de Nf (NfL y pNfH) en el LCR están aumentados en pacientes de ELA aproximadamente 5-10 veces más que en controles sanos. También están aumentados en sangre, pero como los Nf son producidos por las neuronas, los niveles séricos son 10 veces más bajos que en el LCR. Aun así, se ha visto una buena correlación entre ambos fluidos, especialmente para pNfH⁽³²⁾.

También hay evidencias de que los niveles de NfL y pNfH se correlacionan con parámetros de mal pronóstico de ELA, como la disminución de la escala funcional de la ELA (Functional Rating Score for Amyotrophic Lateral Sclerosis-Revised – ALSFRS-R-) y la supervivencia⁽³³⁾. Los pacientes de ELA con una rápida progresión muestran concentraciones más elevadas en suero y LCR de pNfH. Asimismo, niveles más altos de NfL se asocian con una progresión más rápida de la enfermedad y una supervivencia más corta⁽³⁴⁾. De igual modo, se ha visto que los niveles de pNfH y NfL en el LCR son significativamente más bajos en los pacientes con progresión lenta de la enfermedad⁽³⁵⁾.

Por lo tanto, la detección temprana de Nf en LCR y sangre podría usarse como biomarcadores pronósticos en la ELA.

2.1.2. Expresión génica

La expresión génica es el proceso por el cual la información codificada por un gen se usa para producir moléculas de ARN que codifican, posteriormente, para proteínas. En los estudios de investigación, este concepto hace referencia al nivel en el que encontramos a un determinado ARN en suero, plasma, etc. La expresión elevada o disminuida de un ARN puede indicar una situación anormal en relación con una patología subyacente.

- **ARNm.** Se han realizado estudios exhaustivos para detectar ARNm expresados de forma diferencial en sangre total y células mononucleares de sangre periférica ⁽³⁶⁾ ⁽³⁷⁾ y varios estudios sobre algunos ARNm seleccionados potencialmente implicados en la patología de la ELA ⁽³⁶⁾ ⁽³⁸⁾. Sin embargo, todavía no se han identificado biomarcadores candidatos evidentes. Se ha realizado una búsqueda bibliográfica sistemática y no detectaron reproducibilidad entre los diferentes estudios relativos a la firma transcriptómica de los tejidos de la ELA. Las razones de la falta de repetibilidad podrían ser diferentes poblaciones de estudio, diferentes tipos de sujetos de control, diferentes fuentes de muestras, diferentes estadios de la enfermedad y el uso de diferentes estrategias metodológicas ⁽³⁹⁾.

También identificaron la expresión diferencial de otros posibles genes candidatos como la galectina 3 (*LGALS3*), que está implicada en la neuroinflamación, y la proteína cinasa C delta (*PRKCD*), que se activa en la apoptosis inducida por mitocondrias ⁽⁴⁰⁾. Se necesitan estudios adicionales para averiguar si alguno de estos u otros ARNm asociados a la ELA podrían utilizarse como biomarcadores circulantes de la ELA.

- **miARN.** Los microARN (miARN) son ARN no codificantes de 17-22 nucleótidos (nt) de longitud, que actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión génica causando la degradación de los ARNm diana o la inhibición de su traducción a través de la unión específica de la secuencia semilla de 6-8 nt de longitud del miARN a la región 3' no traducida (UTR) del ARNm diana ⁽⁴¹⁾. Muchos miARN están evolutivamente conservados y tienen una interacción preferentemente conservada con la mayoría de los ARNm humanos, lo que es indicativo de sus importantes funciones biológicas ⁽⁴²⁾.

Además de los ARNm, los miARN también son potentes reguladores de otros miARN y ARN no codificantes, como los lncARN y los circARN. Un solo miARN puede regular cientos de especies de ARN, lo que convierte a los miARN en importantes reguladores de la homeostasis celular ⁽⁴³⁾. Los miARN están presentes tanto en entornos intracelulares como extracelulares y en casi todos los fluidos biológicos ⁽⁴⁴⁾. Extracelularmente, los miARN se detectan dentro de vesículas de membrana y libremente, formando complejos con otras macromoléculas. Hasta ahora se han identificado más de 2.500 miARN en el genoma humano (miRBase, www.mirbase.org) ⁽⁴⁵⁾ y para cientos de ellos ya se ha descrito su función en el desarrollo y la patología cerebral ⁽⁴⁶⁾.

Los miARN tienen muchas características para ser biomarcadores prometedores de enfermedades humanas. En estudios recientes también han indicado que los miARN pueden detectarse en fluidos biológicos donde conservan el perfil de expresión de las células originales, incluidas las neuronas y se ha demostrado que tienen una gran especificidad y estabilidad ⁽⁴⁷⁾.

Conclusiones

- El diagnóstico de los pacientes con ELA es totalmente clínico y el diagnóstico genético supone un apoyo, principalmente en casos hereditarios que necesitan un consejo genético individualizado.
- Los 4 genes más relevantes y con mayor participación en la patología son, por este orden: *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP* y *FUS*, tanto en los casos esporádicos como de origen hereditario.
- La utilización de las nuevas tecnologías de secuenciación ha mejorado sustancialmente la costo-efectividad del diagnóstico genético en la ELA, pasando de la clásica secuenciación Sanger a distintas aplicaciones de secuenciación masiva (NGS).
- Actualmente, niveles bajos de pNfH y NfL en el LCR parecen estar ligados a una evolución más lenta de la enfermedad, encontrándose en las últimas fases de investigación preclínica como biomarcador pronóstico de la ELA.
- El futuro de los biomarcadores está encaminado a un conjunto de moléculas que formen un “panel” que mejore las prestaciones individuales de cada uno de ellos por separado, proporcionando una alta especificidad y sensibilidad.

Referencias bibliográficas

1. Siddique T, Figlewicz DA, Pericak-Vance MA, Haines JL, Rouleau G, Jeffers AJ, et al. Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N Engl J Med*. 1991 May 16;324(20):1381-4. Erratum in: *N Engl J Med* 1991 Aug 15;325(7):524. Erratum in: *N Engl J Med* 1991 Jul 4;325(1):71. [\[Pubmed\]](#)
2. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci*. 2014 Jan;17(1):17-23. [\[Pubmed\]](#)
3. Corcia P, Couratier P, Blasco H, Andres CR, Beltran S, Meininger V, Vourc'h P. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2017 May;173(5):254-62. [\[Pubmed\]](#)
4. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993 Mar 4;362(6415):59-62. Erratum in: *Nature*. 1993 Jul 22;364(6435):362. [\[Pubmed\]](#)
5. Bewley GC. *Nucleic Acids Research*. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(1):i-i.
6. Robberecht W, Aguirre T, Van den Bosch L, Tilkin P, Cassiman JJ, Matthijs G. D90A heterozygosity in the SOD1 gene is associated with familial and apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 1996 Nov;47(5):1336-9. [\[Pubmed\]](#)
7. Kawamata J, Shimohama S, Takano S, Harada K, Ueda K, Kimura J. Novel G16S (GGC-AGC) mutation in the SOD-1 gene in a patient with apparently sporadic young-onset amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mutat*. 1997;9(4):356-8. [\[Pubmed\]](#)
8. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 1;89(21):10405-9. [\[Pubmed\]](#)
9. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):130-3. [\[Pubmed\]](#)
10. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):572-4. [\[Pubmed\]](#)
11. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2008 Mar 21;319(5870):1668-72. [\[Pubmed\]](#)
12. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009 Feb 27;323(5918):1205-8. [\[Pubmed\]](#)

13. Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. 2009 Feb 27;323(5918):1208-11. [\[PubMed\]](#)
14. Bäumer D, Hilton D, Paine SM, Turner MR, Lowe J, Talbot K, Ansorge O. Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations. *Neurology*. 2010 Aug 17;75(7):611-8. [\[PubMed\]](#)
15. Van Es MA, Veldink JH, Saris CGJ, Blauw HM, Van Vught PWJ, Birve A, et al. Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1083-7. [\[PubMed\]](#)
16. Laaksovirta H, Peuralinna T, Schymick JC, Scholz SW, Lai SL, Myllykangas L, et al. Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genome-wide association study. *Lancet Neurol*. 2010 Oct;9(10):978-85. [\[PubMed\]](#)
17. Shatunov A, Mok K, Newhouse S, Weale ME, Smith B, Vance C, et al. Chromosome 9p21 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the UK and seven other countries: a genome-wide association study. *Lancet Neurol*. 2010 Oct;9(10):986-94. Erratum in: *Lancet Neurol*. 2011 Mar;10(3):205. [\[PubMed\]](#)
18. Morgan S, Shatunov A, Sproviero W, Jones AR, Shoai M, Hughes D, et al. A comprehensive analysis of rare genetic variation in amyotrophic lateral sclerosis in the UK. *Brain*. 2017 Jun 1;140(6):1611-8. [\[PubMed\]](#)
19. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):257-68. [\[PubMed\]](#)
20. DeJesús-Hernández M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):245-56. [\[PubMed\]](#)
21. Majounie E, Renton AE, Mok K, Doppler EG, Waite A, Rollinson S, et al.; Chromosome 9-ALS/FTD Consortium; French research network on FTLD/FTLD/ALS; ITALSGEN Consortium. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2012 Apr;11(4):323-30. [\[PubMed\]](#)
22. Mok K, Traynor BJ, Schymick J, Tienari PJ, Laaksovirta H, Peuralinna T, et al. Chromosome 9 ALS and FTD locus is probably derived from a single founder. *Neurobiol Aging*. 2012 Jan;33(1):209.e3-8. [\[PubMed\]](#)
23. Byrne S, Heverin M, Elamin M, Walsh C, Hardiman O. Intermediate repeat expansion length in C9orf72 may be pathological in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014 Mar;15(1-2):148-50. [\[PubMed\]](#)

24. Rohrer JD, Isaacs AM, Mizielińska S, Mead S, Lashley T, Wray S, et al. C9orf72 expansions in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 2015 Mar;14(3):291-301. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2015 Apr;14(4):350. [\[Pubmed\]](#)
25. Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, Lashley T, Mok K, Shakespeare T, et al. Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain.* 2012 Mar;135(Pt 3):736-50. [\[Pubmed\]](#)
26. García-Redondo A, Dols-Icardo O, Rojas-García R, Esteban-Pérez J, Cordero-Vázquez P, Muñoz-Blanco JL, et al. Analysis of the C9orf72 gene in patients with amyotrophic lateral sclerosis in Spain and different populations worldwide. *Hum Mutat.* 2013 Jan;34(1):79-82. [\[Pubmed\]](#)
27. Murray ME, DeJesús-Hernández M, Rutherford NJ, Baker M, Duara R, Graff-Radford NR, et al. Clinical and neuropathologic heterogeneity of c9FTD/ALS associated with hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *Acta Neuropathol.* 2011 Dec;122(6):673-90. [\[Pubmed\]](#)
28. Hensman Moss DJ, Poulter M, Beck J, Hehir J, Polke JM, Campbell T, et al. C9orf72 expansions are the most common genetic cause of Huntington disease phenocopies. *Neurology.* 2014 Jan 28;82(4):292-9. Erratum in: *Neurology.* 2014 May 13;82(19):1753. [\[Pubmed\]](#)
29. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7. [\[Pubmed\]](#)
30. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010 Sep;38(16):e164. [\[Pubmed\]](#)
31. Fuentes-Arderiu X. What is a biomarker? It's time for a renewed definition. *Clin Chem Lab Med.* 2013 Sep;51(9):1689-90. [\[Pubmed\]](#)
32. De Schaepdryver M, Jeromin A, Gille B, Claeys KG, Herbst V, Brix B, et al. Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018 Apr;89(4):367-73. [\[Pubmed\]](#)
33. Poesen K, Van Damme P. Diagnostic and Prognostic Performance of Neurofilaments in ALS. *Front Neurol.* 2019 Jan 18;9:1167. [\[Pubmed\]](#)
34. Abu-Rumeileh S, Vacchiano V, Zenesini C, Polischi B, de Pasqua S, Fileccia E, et al.; BoReALS. Diagnostic-prognostic value and electrophysiological correlates of CSF biomarkers of neurodegeneration and neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 2020 Jun;267(6):1699-708. [\[Pubmed\]](#)
35. Poesen K, De Schaepdryver M, Stubendorff B, Gille B, Muckova P, Wendler S, et al. Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease. *Neurology.* 2017 Jun 13;88(24):2302-9. [\[Pubmed\]](#)

36. Van Rheenen W, Diekstra FP, Harschnitz O, Westeneng HJ, van Eijk KR, Saris CGJ, et al. Whole blood transcriptome analysis in amyotrophic lateral sclerosis: A biomarker study. *PLoS One*. 2018 Jun 25;13(6):e0198874. [\[Pubmed\]](#)
37. Gagliardi S, Zucca S, Pandini C, Diamanti L, Bordoni M, Sproviero D, et al. Long non-coding and coding RNAs characterization in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Spinal Cord from Amyotrophic Lateral Sclerosis patients. *Sci Rep*. 2018 Feb 5;8(1):2378. [\[Pubmed\]](#)
38. Kuźma-Kozakiewicz M, Berdyński M, Morita M, Takahashi Y, Kawata A, Kaida K, et al. Recurrent K3E mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2013 Dec;14(7-8):608-14. [\[Pubmed\]](#)
39. Vijayakumar UG, Milla V, Cynthia Stafford MY, Bjourson AJ, Duddy W, Duguez SM. A Systematic Review of Suggested Molecular Strata, Biomarkers and Their Tissue Sources in ALS. *Front Neurol*. 2019 May 14;10:400. [\[Pubmed\]](#)
40. Liguori M, Nuzziello N, Introna A, Consiglio A, Licciulli F, D'Errico E, et al. Dysregulation of MicroRNAs and Target Genes Networks in Peripheral Blood of Patients With Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2018 Aug 28;11:288. Erratum in: *Front Mol Neurosci*. 2019 Jan 10;11:488. [\[Pubmed\]](#)
41. Cloutier F, Marrero A, O'Connell C, Morin P Jr. MicroRNAs as potential circulating biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2015 May;56(1):102-12. [\[Pubmed\]](#)
42. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018 Mar 22;173(1):20-51. [\[Pubmed\]](#)
43. Eichhorn CD, Kang M, Feigon J. Structure and function of preQ1 riboswitches. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Oct;1839(10):939-50. [\[Pubmed\]](#)
44. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010 Nov;56(11):1733-41. [\[Pubmed\]](#)
45. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D68-73. [\[Pubmed\]](#)
46. Godlewski J, Lenart J, Salinska E. MicroRNA in Brain pathology: Neurodegeneration the Other Side of the Brain Cancer. *Noncoding RNA*. 2019 Feb 23;5(1):20. [\[Pubmed\]](#)
47. Rao P, Benito E, Fischer A. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. *Front Mol Neurosci*. 2013 Nov 26;6:39. [\[Pubmed\]](#)