

Trabajo Fin de Grado
Grado en Medicina

ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Autor:

Josune Etxabe Gurrutxaga

Director/a:

Adolfo López de Munain

© 2018, Josune Etxabe Gurrutxaga:

Leioa, 17 de abril de 2018

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. DATOS GENERALES. FORMAS CLÍNICAS.....	1
1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ELA: ENTRE LO GENÉTICO Y/O AMBIENTAL.....	2
1.3. ELA Y METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR.....	10
1.4. LA GLUCOLISIS.....	12
2. HIPÓTESIS.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
4.1. PACIENTES Y CONTROLES.....	17
4.2. PROCEDIMIENTOS.....	17
5. RESULTADOS.....	22
5.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
5.1.1. Tabla 2X2.....	28
5.1.2. t-student.....	29
6. DISCUSIÓN.....	32
7. CONCLUSIONES.....	32
8. BIBLIOGRAFIA.....	35

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DATOS GENERALES. FORMAS CLÍNICAS

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), es un trastorno neurodegenerativo que afecta a las motoneuronas a nivel cerebral, troncal y espinal, causando debilidad y atrofia muscular progresiva y finalmente, la muerte. Es también conocida como la enfermedad de la motoneurona (MND) o bien como la enfermedad de Lou Gehrig en EEUU (ex jugador de béisbol de los Yankees de Nueva York, retirado por esta enfermedad en el año 1939), o la enfermedad de Charcot en Francia (que fue el primero en describir la enfermedad en 1874). El cuadro clínico de la ELA es consecuencia de la afectación concurrente de las neuronas motoras superiores e inferiores que inervan finalmente la musculatura estriada para la contracción muscular. La afectación de la primera motoneurona es la responsable de la rigidez, la hiperreflexia y el signo de Babinski que se encuentra en estos pacientes, mientras que la pérdida de las motoneuronas inferiores origina fasciculaciones, calambres y atrofia muscular progresiva (Ince et al., 1998). Dependiendo de dónde comiencen los síntomas, clasificamos la enfermedad en dos tipos: *espinal* (65% de los casos) con comienzo en las extremidades, y *bulbar* (30%) la cual debuta con disartria y/o disfagia desde el inicio de la enfermedad. El 5% restante presenta un cuadro de evolución rápidamente tórpida con fallo respiratorio (Gordon et al., 2006; Hardiman et al., 2011; Kiernan et al., 2011). Por último, hay que destacar la excepción de afectación de la musculatura estriada extrínseca ocular y la musculatura cardíaca, las cuales mantienen su funcionalidad en la ELA.

En cuanto a la epidemiología, las tasas de incidencia en Europa y Norteamérica oscilan entre 1,5 y 2,7 por 100.000 habitantes/año, mientras que las tasas de prevalencia oscilan entre 2,7 y 7,4 por 100.000 (Worms et al., 2001; Logroscino et al., 2010; Jordan et al., 2015). Hay estudios que concluyen mayores tasas de ELA entre los caucásicos en comparación con los grupos étnicos africanos, asiáticos e hispanos, pero son objeto de controversia. La relación hombre-mujer es de aproximadamente 1,3-1,5/1 y el pico de incidencia ocurre entre los 50 y 75 años, disminuyendo a partir de entonces (Chio et al., 2009; O'Toole et al., 2008; Joensen et al., 2010).

A pesar de la extensa lista de fármacos ensayados, el Riluzole y recientemente el Edaravone son los únicos fármacos que han tenido algún impacto en la supervivencia de la ELA, aumentándola por pocos meses. Las dianas de estos fármacos son la excitotoxicidad del glutamato a nivel central y el estrés oxidativo respectivamente. Se cree que el Riluzole actúa sobre la excitotoxicidad por tres mecanismos distintos: 1) la inhibición de la liberación de ácido glutámico, 2) el bloqueo no competitivo de las respuestas mediadas por el receptor NMDA y 3) la acción directa sobre el canal de sodio dependiente del voltaje (Doble, 1996). Sin embargo, su mecanismo de acción preciso en la ELA no está claro. Lo mismo ocurre con Edaravone, un fármaco recientemente aprobado por la FDA para tratar a pacientes con ELA. Su efecto antioxidante apoya la hipótesis de que el estrés oxidativo podría ser parte del proceso que daña las neuronas de estos pacientes. A pesar de los esfuerzos actuales en encontrar estrategias terapéuticas para esta enfermedad, estos fármacos no aumentan de forma significativa la esperanza de vida y la mayoría de los pacientes mueren dentro de un tiempo promedio que oscila entre 2 y 5 años desde el diagnóstico, generalmente debido a una insuficiencia respiratoria (Bensimon et al., 1994; Shaw et al., 2001).

1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ELA: ENTRE LO GENÉTICO Y/O AMBIENTAL

La patología de la ELA se caracteriza por la degeneración y la muerte de la neurona motora en la que ocurren varios eventos fisiopatológicos que conducen a la neurodegeneración. Entre ellas destacan el aumento del estrés oxidativo, los defectos en el transporte axonal y en la sinapsis, las alteraciones del procesamiento del ARN, etc. (Zufiria et al., 2016). Sin embargo, los defectos en el metabolismo proteico parecen tener un mayor peso en cuanto a la patología. Bajo un estrés oxidativo crónico el retículo endoplasmático (RE), una organela esencial para la correcta síntesis proteica, sufre una fragmentación y pérdida de sus cisternas. En consecuencia, se acumulan proteínas defectuosas y mal empaquetadas en el citoplasma celular (Oyanagi et al., 2008; Sasaki et al., 2010). Estos hallazgos son distintivos en la patología de la ELA, lo cual nos conlleva a considerar un fallo tanto en la síntesis como en la lisis proteica. De hecho, se han descrito respuestas autofágicas incontroladas y un colapso a nivel proteasómico en pacientes con ELA. Estos, son dos mecanismos que llevan a

cabo la eliminación y degradación de las proteínas. En posible relación con dichas alteraciones, se considera que la acumulación de las proteínas TDP-43 y FUS tiene gran importancia en el proceso neurodegenerativo más allá de ser una mera consecuencia de la enfermedad (Al-Sarraj et al., 2011; Ince et al., 2011). En la ELA estas inclusiones están ubiquitinizadas y suelen formarse en las neuronas motoras espinales. En cambio, las formas bulbares se han relacionado con expansiones repetidas del hexanucleótido GGGGCC en el gen C9ORF72 (Debray et al., 2013; Ratti et al., 2012).

Respecto a la etiología, esta es múltiple y en gran medida desconocida salvo en las formas familiares, en los que diversas mutaciones en diferentes genes originan los casos familiares de la ELA que constituyen el 10% de todos los casos, siendo el resto casos esporádicos (el 90% del total). En estos últimos, se estima que la combinación de la genética con la exposición a varios factores ambientales desconocidos es necesaria para desencadenar la enfermedad. Notablemente, un reciente estudio poblacional de Al-Chalabi y colaboradores (2014) estima mediante el uso de un modelo matemático que la esclerosis lateral amiotrófica es resultado de un proceso multipaso en el que hipotéticamente se podrían necesitar hasta 6 pasos diferentes bien genéticos y/o ambientales para llegar a desencadenar la enfermedad. Este modelo resulta ser válido para ambos tipos esporádico y familiar, aunque con pasos que serán probablemente diferentes y ordenados de diferente forma. De esta manera, la ELA familiar con mutaciones familiares de alta penetrancia podría interpretarse como un proceso de un solo paso, aunque otros pasos menores (genéticos y / o ambientales) determinarían la edad de inicio, la gravedad de los síntomas y la variabilidad de las manifestaciones clínicas. Cualquiera que sea la combinación de los pasos en esta enfermedad multifactorial, parece fuera de toda duda que la exposición ambiental a agentes tóxicos desconocidos o la vulnerabilidad genética de algunas personas a tóxicos tolerados por la población general juegan un papel importante en este proceso.

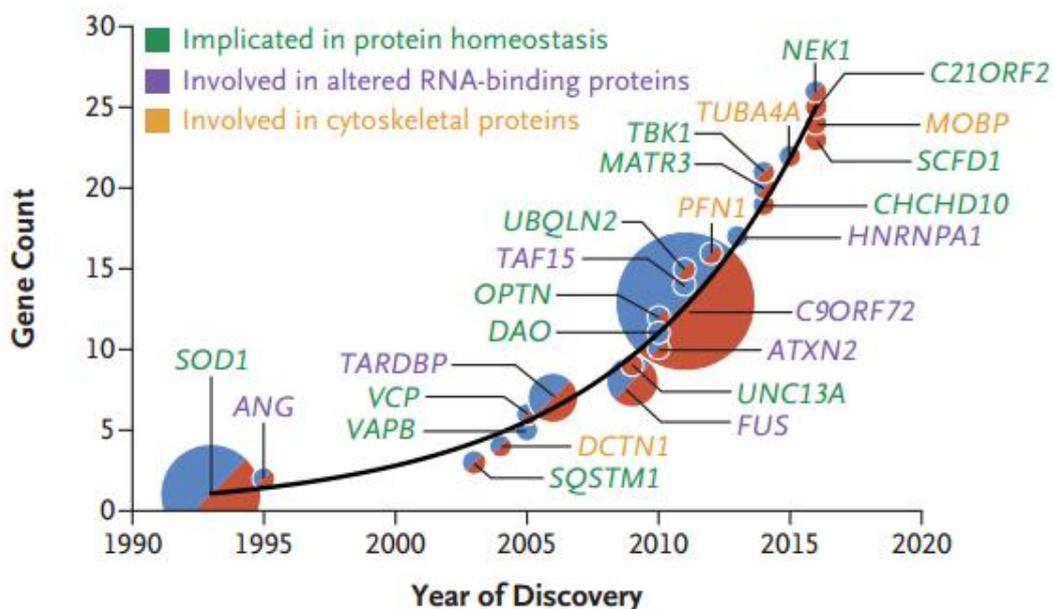


Figura 1. Recuento de genes por año de descubrimiento. Cada esfera representa un gen que se ha asociado con la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Las esferas se colocan en el eje x según el año en que se descubrió la asociación por primera vez. El tamaño de cada esfera es proporcional al número de publicaciones relacionadas con ALS sobre ese gen o su producto proteico. Tomado de *Al Chalabi et al., 2017*

Entre los factores ambientales implicados en el desarrollo de la ELA, se encuentran los metales pesados (mercurio, selenio y plomo) y la exposición a los pesticidas que, entre sus componentes, contienen compuestos organofosforados que inhiben irreversiblemente la AChE induciendo la excitotoxicidad y el daño cerebral como posibles inductores de la enfermedad (Chen, 2012). Por otra parte, la beta-N-metilamino-L-alanina (BMAA) se resalta como potencial agente tóxico en algunos estudios de grupo como el de la población de *Chamorros* en Guam o en la isla Honshu en Japón, entre otros. Se han encontrado moléculas de BMAA en el cerebro de estos ciudadanos con ELA durante su estudio postmortem, y no en los ciudadanos controles (Murch et al., 2004a, 2004b). Además de los mencionados, existe una larga lista de estudios epidemiológicos que señalan otros factores potencialmente implicados en la ELA como el tabaco, el consumo de alcohol, las infecciones fúngicas y virales, la radiación electromagnética y la exposición a toxinas de origen desconocido, como ha sido detectado entre los combatientes de la guerra del Golfo de Persia 1992 (Horner et al., 2008; Zhou et al., 2012). Entre los componentes incluidos en el tabaco estarían

algunos metales pesados como el cadmio o el mercurio, los residuos de pesticidas y el formaldehído. Sobre el cadmio existen evidencias que apoyarían su papel en la neurodegeneración, por su comportamiento como inhibidor de la actividad enzimática Cu/Zn SOD1 (Huang et al., 2006), y hay evidencias experimentales que demuestran el riesgo aumentado en los pacientes expuestos al formaldehído, por provocar estrés oxidativo al reducir la actividad del SOD1 (Nie et al., 2007) e inducir el daño mitocondrial (Gurel et al., 2005). Y por último, entre los factores ambientales destacan la importancia del estilo de vida. Hay varios estudios que informan que la actividad física intensa y vigorosa podría estar asociada a la enfermedad, ya que los profesionales del deporte (triatletas, futbolistas, esquiadores de fondo) suelen estar presentes en los estudios de cohorte de la ELA (Beghi et al., 2010; Gotkine et al., 2014; Chio et al., 2005; Fang et al., 2015), mientras que el ejercicio moderado podría ser protector (Pupillo et al., 2014). Por otra parte, los pacientes con ELA que además presentan hiperglucemia e hiperlipidemia (síndrome metabólico) parecen tener un mejor pronóstico vital, lo que induce a hipotetizar que en la ELA podría existir un balance energético negativo, es decir, un mayor gasto que la producción de energía, lo que podría ser una de las claves en cuanto a la fisiopatología del evento inicial en la ELA.

En cuanto al factor genético, tenemos genes causativos con un patrón hereditario de transmisión autosómico dominante, recesivo o ligado al X, relacionados con las formas familiares, y por otra parte, genes de susceptibilidad que aumentan el riesgo de desarrollar la forma esporádica de la enfermedad. Los más relevantes se presentan en la siguiente tabla, clasificados de acuerdo a su función putativa a nivel celular.

GEN	LOCALIZACIÓN CROMOSOMICA	HERENCIA	EDAD MEDIA DE COMIENZO	PROTEÍNA	FUNCIÓN DEFECTIVA DE LA PROTEÍNA / AGREGADOS	RASGOS ASOCIADOS	REFERENCIAS
ALS1/SOD1	21q22.11	dominante/recesivo	47	SOD1	Alteraciones metabólicas, transporte axonal dañado	Motoneuronas superiores e inferiores. Amiotrofia, ataxia...	Rosen et al. (2013)
FUS	16p11.2	dominante/recesivo	46	FUS (fused in sarcoma)	Procesamiento alterado del RNA	Motoneuronas superiores e inferiores y FTD	Vance et al. (2009) and Kwiatkowski et al. (2009)
ALS8/VAPB	20q13.3	dominante	44	VAMP	Tráfico vesicular	Motoneuronas superiores e inferiores	Nishimura et al. (2004) and Landers et al. (2008)
ALS10/TARDBP	1p36.22	dominante/recesivo (raro)	55	TDP-43	Splicing del RNA	Motoneuronas superiores e inferiores y FTD	Gitcho et al. (2009), Sreedharan et al. (2008) and Kabashi et al. (2008)
ALS12/OPTN	10p15-p14	dominante/recesivo	51	optineurina	Conservación del Golgi, excitosis.	Motoneuronas superiores e inferiores, FTD, glaucoma, Paget...	Maruyama et al. (2010) and Iida et al. (2012a, 2012b)
ALS14/VCP	9p13.3	dominante	49	VCP	Degradación proteosómica. Agregados de TDP-43	FTD, parkinsonismo, Paget	Johnson et al. (2010) and Haubenberger et al. (2005)
ALS15/UBQLN2	Xp11.21	dominante ligado a X	41	ubiquilina-2	Inclusiones ubiquitinizadas	Motoneuronas superiores e inferiores y FTD	Deng et al. (2011) and Williams et al. (2012)
ALS17/CHMP2B	3p11.2	dominante	50-75	CHMP2b	MVBs	Motoneuronas superiores e inferiores. Participación bulbar	Skibinski et al. (2005), Parkinson et al. (2006) and Cox et al. (2010)
ERBB4/ALS19	2q34	dominante/espórádico	60-70	ERBB4	Consumo de la glucosa	Motoneuronas superiores e inferiores	Takahashi et al. (2013)
C9ORF72/FTDA LS1	9p21.2	dominante	57	C9orf72	Transporte endosomal y autofagia	Motoneuronas superiores e inferiores y FTD	Renton et al. (2011) and De Jesus Hernandez et al. (2011)
SQSTM1	5q35.3	dominante		P62/sequestosoma-1	Regula el metabolismo de la glucosa	Paget	Hocking et al. (2002) and Laurin et al. (2002)

Tabla 1. Relación de los genes relacionados con la herencia mendeliana de la ELA.

Tomado de *Zufiria et al., 2016.*

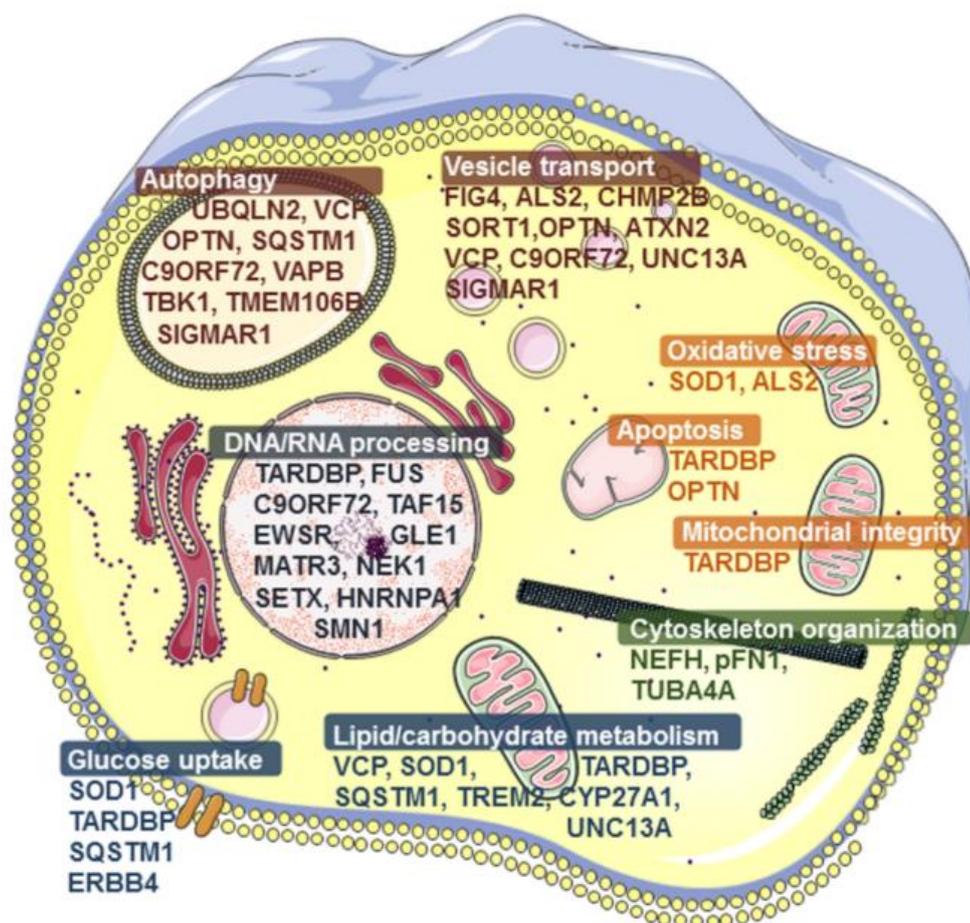


Figura 2. Función celular principal de los genes involucrados en la ELA.

Tomado de Zufiria et al., 2016.

Las proteínas codificadas por estos genes tendrán diferentes funciones celulares: el procesamiento del ADN/ARN, el transporte vesicular, la autofagia, la organización del citoesqueleto, la apoptosis, la integridad mitocondrial y la regulación del metabolismo energético. Es en esta última función metabólica en la que nos centraremos en este trabajo.

Dentro de todos los genes descritos los más frecuentes son los siguientes:

- *SOD1*
El Superóxido dismutasa-1 fue el primer gen implicado en la ELA familiar. Codifica para una proteína mitocondrial que lleva el mismo nombre. La enzima SOD1 se une a las moléculas de cobre y zinc para descomponer las ROS, participando de esta manera en los procesos de estrés oxidativo. A nivel celular,

cumple su función regulando el consumo de la glucosa y el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Un estudio encontró que la eliminación de SOD1 conduce a una disminución de la producción de glucosa en el hígado y al almacenamiento de glucógeno, y a un aumento de los perfiles de lípidos hepáticos en ratones adultos. La ausencia de SOD1 se asoció además a una tolerancia alterada de la glucosa y a un deterioro de la función y pérdida de volumen de las células beta, así como a niveles reducidos de triglicéridos en plasma, niveles aumentados del glucagón y a la disminución de la masa grasa (Wang et al., 2012; Muscogiuri et al., 2013; Dodge et al., 2013).

Se han descubierto al menos 200 mutaciones en el gen SOD1 que pueden causar la ELA. Aproximadamente la mitad de todos los estadounidenses con ELA causada por mutaciones del gen SOD1 tienen una mutación particular: G93A. La ELA causada por la mutación A5V generalmente se asocia con una esperanza de vida más corta en comparación con la ELA causada por otras mutaciones genéticas. No está claro por qué las motoneuronas son particularmente sensibles a las mutaciones del gen SOD1, aunque se han descrito estas posibilidades: un aumento de radicales superóxido nocivos, una mayor producción de otros tipos de radicales tóxicos, un aumento de la muerte celular o la acumulación de agregados de la proteína SOD mal plegada que puede ser tóxica para las células (Abu-Hamad et al., 2017).

- *TARDBP*

Este gen codifica para la TDP-43, una proteína con diversas funciones. Participa tanto en el procesamiento del ADN/ARN como en la apoptosis celular, en la integridad mitocondrial y en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Stallings et al., 2013; Chiang et al., 2010). Se han descrito al menos 60 mutaciones en este gen TARDBP que puedan causar la ELA. Los cambios en la proteína TDP-43 hacen que la proteína se pliegue erróneamente y forme agregados de proteínas en las neuronas motoras, como habíamos mencionado anteriormente. Se ha descrito en un reciente estudio que el TDP-43 está especialmente relacionado con la activación del AMPK, por lo cual estaría de la misma manera implicado en el consumo de la glucosa a nivel

muscular durante el ejercicio (Perera et al., 2014). Algunas personas con ELA causada por mutaciones del gen TARDBP también desarrollan una afección llamada demencia frontotemporal (FTD) pero no está claro por qué algunas personas con mutaciones en el gen TARDBP desarrollan FTD y otros no (Geser et al., 2009).

- *FUS*

Actúa a nivel del núcleo celular. Participa en muchos de los pasos de la producción de proteínas. Se ha descubierto que al menos 85 mutaciones en el gen FUS causan ELA. Estas mutaciones pueden interferir con el transporte de ARNm fuera del núcleo de las células. Como resultado, la proteína FUS y el ARNm quedan atrapados dentro de las células y es probable que formen agregados. Las personas con ELA causadas por mutaciones en el gen FUS tienden a desarrollar la enfermedad a una edad más temprana y tienen una esperanza de vida menor en comparación con las personas que tienen ELA o ELA esporádicas causadas por mutaciones en otros genes.

- *C9ORF72*

El gen C9ORF72 codifica para la proteína C9ORF72, cuya localización se presume que se ubica en la región presináptica de la neurona. El gen contiene un segmento de ADN formado por una serie de seis nucleótidos; GGGGCC, y se ha visto que la expansión de la repetición de este hexanucleótido a más de 30 podría causar la ELA (Haeusler et al., 2014). Las interrupciones en la función de la proteína C9ORF72 pueden conducir a la muerte prematura de la neurona motora, lo que da como resultado los signos y síntomas de la ELA. Sin embargo, se ha visto que a pesar de que se trate de la mutación familiar más frecuente, individuos con esa expresión expansiva no presentan fenotipo ELA ni DFT, con lo que no está del todo claro si es una causa directa o uno de los varios factores genéticos que están actuando comúnmente en el desarrollo de esta patología (Waite et al., 2013).

Además de estos, en la ELA se describen otros genes menores o de susceptibilidad cuya alteración podría estar involucrada en la causa de la enfermedad. El gen *OPTN*, por ejemplo, que participa en la autofagia y en el transporte vesicular; *EWSR* y *TAF-15* relacionados con el metabolismo del ARN; el *PFNI* implicada en la organización del citoesqueleto o más raramente conocidas como el *ALS2*, *SIGMARI*, *SETX*, etc., pueden tener cierta relación con la ELA.

Hasta la fecha, estas alteraciones genéticas solas o en conjunción con causas ambientales se consideran causa patogénica primaria que es la degeneración y muerte de la neurona motora, cuya traducción neuropatológica sería mayoritariamente los depósitos de TDP-43 tanto en formas esporádicas como familiares con alguna excepción (depósitos de FUS en las ELA asociadas a mutaciones en FUS).

1.3. ELA Y METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR

Hay un conjunto creciente de evidencias a favor de que existe en muchos casos de ELA (fundamentalmente esporádicos) un sustrato metabólico periférico, que se localizaría a nivel de la fibra muscular o la unión neuromuscular que sería causa primaria, generando secundariamente el daño neuronal con las consecuencias clínicas conocidas. Estas evidencias que reflejan un deterioro en la homeostasis energética son las siguientes:

- ✓ Pérdida de masa muscular y grasa subcutánea (Lim et al., 2012).
- ✓ Esteatosis hepática presente hasta en el 76% de pacientes con ELA en una cohorte japonesa (Nodera et al., 2015).
- ✓ Niveles de glucagón y triglicéridos alterados (Moriwaka et al., 1993; Dogde et al., 2013; Goto et al., 1972; Den Boer et al., 2004).
- ✓ Elevado consumo de O₂ e hipercatabolismo (Desport et al., 2001; Desport et al., 2001, 2005; Huisman et al., 2015)
- ✓ Deficiencias en la utilización de glucosa y beta oxidación de ácidos grasos (Pradat et al., 2010; Sanjak et al., 1987; Dupuis et al., 2004).

- ✓ Niveles elevados de amonio y aminoácidos en plasma de pacientes (Patten et al., 1982)
- ✓ La diabetes tipo I y el ejercicio intenso como factores de riesgo (Mariosa et al., 2015).
- ✓ Modelos animales con déficit de energía, descenso de las reservas energéticas, aumento de consumo de lípidos por el músculo esquelético. (Dupuis L. et al., 2003, Wang et al., 2012, Donge et al., 2013).

El estudio del catabolismo, es decir, de los procesos implicados en la combustión de biomoléculas con el fin de obtener energía en diferentes formas (ATP y calor), podría explicar algunos aspectos de la enfermedad. Así, un estado hipercatabólico derivado de un consumo excesivo de energía o de un déficit intrínseco en la producción de la misma, podría generar mecanismos alternativos de combustión con producción de metabolitos intermedios que en un determinado contexto de detoxificación insuficiente conducirían al daño neuronal.



Figura 3. Aspecto físico del estado hipercatabólico en un paciente con ELA.

Identificar los procesos metabólicos subyacentes a nivel periférico, su relación con los factores de riesgo o protectores identificados (ejercicio físico o alto índice de masa corporal) podría conducir a una nueva visión de la enfermedad y quizás a nuevos y más exitosos enfoques terapéuticos para las fases precoces que deberían ser completados en todo caso, con estrategias para combatir la propagación del fenómeno neurodegenerativo.

Podemos hipotetizar que una pérdida de función de algunos de los genes involucrados en la ELA, podría generar un estado hipercatabólico que desembocaría en la muerte neural y la clínica sistémica observada en pacientes. De acuerdo a este enfoque, la ELA podría clasificarse como una enfermedad de fisiopatología descendente (ELA primaria o neurodegenerativa pura) o ascendente (ELA secundaria o metabólica).

Diversos datos epidemiológicos y experimentales avalarían la hipótesis de una implicación de la glucólisis en este estado hipercatabólico. Por un lado, se ha detectado

en pacientes con ELA una cierta tendencia a la intolerancia a la glucosa (Ioannides et al., 2016), así como un aumento del riesgo de padecer ELA en pacientes con Diabetes mellitus tipo 1, mientras que por otro lado, los genes TARDP43, SOD1, SQSTM1 implicados en formas mendelianas de la enfermedad participan en la regulación del metabolismo glucídico.

1.4. LA GLUCOLISIS

La glucolisis es una vía metabólica dual (anabólica y catabólica) que ocurre en el citosol de la célula. Es anabólica porque sus intermediarios metabólicos son precursores biosintéticos de biomoléculas como el ADN, ARN, coenzimas, etc., y también catabólica porque de ella se obtiene ATP y NADH. Se resume como una secuencia de 10 reacciones individuales divididas en dos etapas: la primera de inversión de energía y la segunda de producción. Sus etapas reguladoras son las reacciones irreversibles catalizadas por la hexokinasa, PFK1 y PFK2, y la piruvato kinasa. Además de las mencionadas, hay una reacción que aunque no sea irreversible es crucial en este proceso ya que necesita la coenzima oxidada NAD⁺ para que se produzca la reacción. Esta coenzima se obtiene precisamente en la etapa posterior a la glucolisis; la fermentación láctica. La fermentación láctica es una reacción necesaria para la regeneración de la glucolisis debido a la liberación de la coenzima NAD⁺, imprescindible en la etapa anteriormente mencionada. Para ello, es importante el mantenimiento de un nivel óptimo de piruvato en el citosol.

En el SNC el funcionamiento del metabolismo energético varía dependiendo de las condiciones de disponibilidad de nutrientes y oxígeno. Cuando la glucosa, el combustible por excelencia, atraviesa la barrera hemato-encefálica entra en los astrocitos mediante la molécula transportadora GLUT1. Los astrocitos, que actúan como soporte metabólico de las neuronas, transforman la glucosa en piruvato y este en lactato a través de la vía glucolítica y la fermentación láctica, respectivamente. Luego el lactato es bombeado al espacio extracelular y captado por la neurona, en la que existe una enzima específica que es capaz de reconvertir el lactato en piruvato para poder oxidarlo en el ciclo de Krebs y en la cadena respiratoria para la obtención de ATP. La

glucólisis astrocítica juega por tanto un papel crucial en el mantenimiento del metabolismo neuronal aerobio.

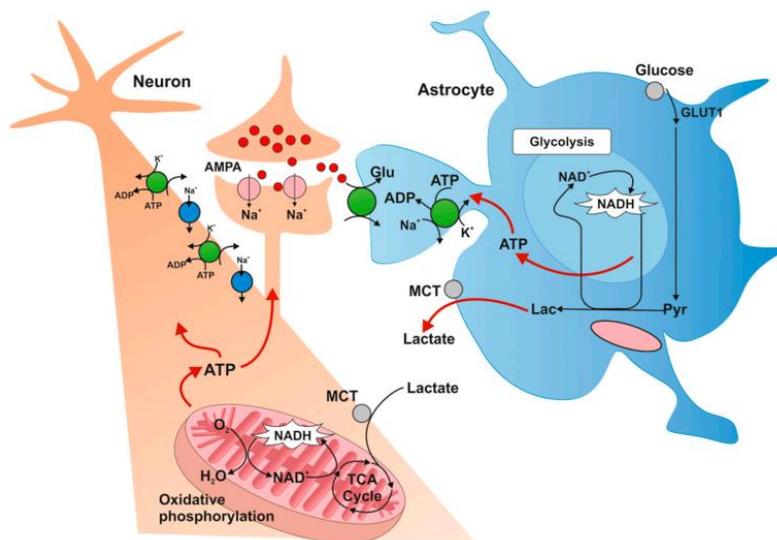


Figura 4. Representación del metabolismo energético en el SNC. Tomado de *Falkowska et al., 2015*.

En este contexto, no resulta extraño hipotetizar que de forma paralela el lactato liberado en la unión neuromuscular por la acción de la glucólisis en el músculo, deba jugar un papel importante sobre la motoneurona como ocurre a nivel central con lo descrito anteriormente respecto al acoplamiento metabólico entre la neurona y el astrocito. Por esta razón, la disfunción en la regulación de la glucólisis muscular por parte de algunos genes involucrados en la ELA podría ser uno de los eventos iniciales extraneurales que generarían el cuadro fisiopatológico degenerativo de manera secundaria.

A nivel central no es posible analizar la glucólisis in vivo, pero sí a nivel periférico. Por ello, y dado que ya hemos descrito evidencias que apuntan a un hipercatabolismo en la ELA, nos proponemos estudiar la glucólisis periférica en la enfermedad como vía para confirmar la hipótesis de un desarreglo energético primario como causa de la enfermedad.

De manera más concreta, en este trabajo se estudia la relación entre la Esclerosis Lateral Amiotrófica y el metabolismo muscular de la glucosa en pacientes esporádicos en los estadios iniciales de la enfermedad.

2. HIPOTESIS

1. La Esclerosis Lateral Amiotrófica podría ser una enfermedad metabólica.
2. Los genes relacionados con la ELA podrían participar en la regulación del metabolismo energético anaerobio.
3. El mal funcionamiento de estos genes podría generar una alteración energética muscular que reflejaría la debilidad progresiva muscular observada en esta patología.

3. OBJETIVO

Estudio del metabolismo anaerobio muscular en pacientes esporádicos en estadios iniciales con Esclerosis Lateral Amiotrófica.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio de casos y controles pareados por edad y sexo.

4.1. PACIENTES Y CONTROLES

Los pacientes fueron reclutados de a consulta de ELA de la Unidad de Enfermedades Neuromusculares del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Donostia. Todos ellos fueron informados del objetivo del estudio y firmaron un consentimiento informado aprobado por el CEIC del Hospital. El criterio de inclusión al estudio de los pacientes es el ser diagnosticado recientemente de esta enfermedad en estadio inicial, cuando la función motora de las extremidades superiores está aún mantenida, y que tuviesen algún familiar no consanguíneo/conocido que pudiera participar conjuntamente en el estudio, en su caso como control. Los controles se reclutaron entre los familiares no consanguíneos/amigos aportados de los pacientes.

4.2. PROCEDIMIENTOS

4.2.1. Test de isquemia

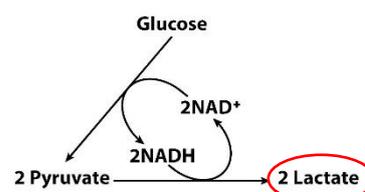
Es una de las técnicas diagnósticas utilizadas en la enfermedad de McArdle o glucogenosis tipo V, descrita por el mismo McArdle y estandarizada por Munsat (McArdle 1956; Munsat 1970). Esta es una enfermedad metabólica hereditaria recesiva, con predominio masculino, y con evidencia de heterogeneidad alélica (Chen et al., 2000). Consiste en una deficiencia congénita de la enzima miofosforilasa alfa-1,4-glucanortofosfato glucosiltransferasa, que interviene en la degradación del glucógeno en ácido láctico, iniciando la ruptura del glucógeno con liberación de glucosa-1-fosfato. A la deficiencia o ausencia de dicha enzima, por tanto, el glucógeno termina por acumularse en los músculos, ocasionando disminución de la capacidad para el ejercicio, debilidad muscular, calambres y dolor.

El test de isquemia consiste en generar una hipoxemia transitoria en uno de los antebrazos y en esa condición anaeróbica realizar un ejercicio físico de agarre sucesivo de algún objeto que permita la contracción rítmica de los músculos flexores y

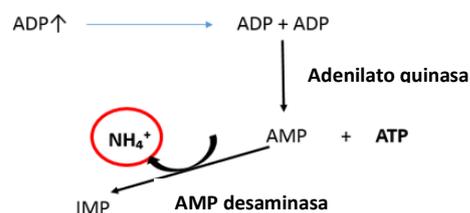
extensores de los dedos de la mano. Esta condición de anerobiosis local, obliga a los músculos a utilizar la vía glucolítica anaerobia como vía de obtención de ATP necesario para la contracción muscular. De esta manera se pueden observar la existencia o no de alteraciones en el metabolismo de la glucosa.

La finalidad de este método ha sido objetivar el proceso metabólico anaerobio muscular de nuestros pacientes, basándonos en los parámetros del lactato y comparándolos estos con los resultados de los controles. En un individuo sano, se produce un incremento de lactato de 4 a 6 veces superior al valor basal con un pico máximo a los 1-2 minutos tras el ejercicio. En pacientes con la enfermedad de McArdle, en cambio, hay un mínimo o nulo aumento a lo largo de la serie, debido a su incapacidad para la degradación efectiva de glucógeno en lactato.

El ejercicio realizado en un ambiente de hipoxemia provoca la activación de la glucólisis anaeróbica. En este caso, el producto de la glicolisis, el piruvato, se cataliza en un proceso de fermentación láctica por la enzima lactato deshidrogenasa, convirtiéndose así en lactato. De esta manera, analizando los parámetros del lactato podremos conocer el funcionamiento del metabolismo anaerobio de los pacientes.



Sin embargo, además del lactato también hemos analizado los niveles de amonio en cada extracción. Este es un parámetro que nos sirve para controlar la intensidad del ejercicio. Al realizar un ejercicio los niveles de ADP aumentan. Las células lo transforman en AMP y ATP para poder obtener energía a través de un reacción que constituye el sensor de energía catalizada por la enzima adenilato quinasa. A su vez el AMP se transforma en IMP y amonio para mantener activa la reacción sensor de energía desplazando el equilibrio hacia la obtención de ATP, de tal manera que este amonio liberado indicará el ATP consumido para la contracción muscular; la intensidad del ejercicio realizado y será nuestro control para seleccionar los pacientes que han realizado el ejercicio con la intensidad correcta. Así eliminamos la posibilidad de que el ejercicio no se haya hecho correctamente debida



a la propia denervación y analizamos como se activa la glucólisis para una demanda determinada de ATP por parte de la intensidad de contracción muscular reflejada en los niveles adecuados de amonio liberado a sangre.

Con el ejercicio, aumenta de 5 a 10 veces el valor basal del amonio con un pico máximo a los 2-5 minutos. Los que coincidían con el aumento del amonio de 5 a 10 veces respecto a su valor basal han sido introducidos directamente al estudio, quedando fuera el resto, evitando la variable de la debilidad muscular propia de la enfermedad y consolidando los resultados del estudio metabólico.

El material necesitado para llevar a cabo el estudio ha sido el siguiente (por participante):

- 1 esfigmomanómetro



- 1 pelota de goma-espuma



- 5 tubos morados y 5 verdes para la muestra de sangre con las respectivas etiquetas de identificación



- Volantes para laboratorio
- Material necesario para la extracción de sangre: solución antiséptica, guantes, gasas estériles, esparadrapo, palomilla o tubo de vacío, contenedor para el material punzante



- Analizadores de sangre del laboratorio del HUD.
- Cronometro

Los participantes, ambos pacientes y controles, después de ser informados correctamente y tras haber firmado los consentimientos y requisitos necesarios para poder ser incluidos en nuestro estudio, han sido sometidos a un ejercicio isquémico del antebrazo durante 1 minuto. Para empezar, se les ha extraído dos tubos de sangre venosa del brazo con el que iban a realizar el ejercicio. A continuación, se les ha colocado un esfigmomanómetro en el brazo para provocar así una hipoxemia transitoria y entonces han realizado un ejercicio en ambiente anaeróbico que consistía en apretar y soltar sucesivamente una pelota con la mano en una duración de 1 minuto.

Al terminar, y tras soltar la presión del manguito, se les ha vuelto a extraer dos tubos de sangre seriadas a los minutos 1, 3, 5 y 10 tras haber acabado dicho ejercicio. Finalmente, se han analizado en el laboratorio los niveles de lactato y amonio de las muestras obtenidas de estos participantes al estudio.

5. RESULTADOS

Se incluyeron un total de 22 pacientes con ELA esporádica en estadios iniciales y 19 controles no relacionados genéticamente.

La muestra de pacientes y controles fue estratificada teniendo en cuenta la enfermedad (ELA/control), edad y sexo. Posteriormente, después de que realizaran el test de isquemia y tras obtener los resultados de los parámetros necesarios analizados en el laboratorio, he ido añadiendo los valores pertinentes de cada participante en el minuto correspondiente.

Tanto el parámetro del lactato como el del amonio se han valorado de la siguiente manera: el valor obtenido en el minuto 0, esto es, anterior al test de isquemia, lo he convertido al 1 en todos y cada uno de los pacientes. Luego he calculado los valores en los minutos 1, 3, 5 y 10 respecto al del minuto 0. De esta manera, he podido objetivar mejor los resultados obtenidos, ya que mi propósito es valorar el aumento del lactato/amonio respecto al nivel basal, lo cual lo figuro con el valor de 1.

Después de calcular los valores respecto al nivel basal, he calculado el porcentaje máximo de los resultados obtenidos en cada minuto dando un valor del 100% al valor máximo obtenido durante toda la duración del test. El resto, lo he calculado respecto a ese 100% del valor máximo. Es resultado de esto la siguiente tabla.

(Tabla 2).

	ENFERMEDAD	EDAD	SEXO	TIEMPO 0	TIEMPO 1	TIEMPO 3	LA TIEMPO 5	LA TIEMPO 10	LACTATO (Δ)	%maximo t=	%max t=3	%maximo t=	%maximo t=10
1	control		54 hombre	1	5,67	3,67	3,44	2		100	64,7	60,7	35,27
2	control		50 mujer	1	3,06	2,67	2,4	0,67		87,2	100	78,43	21,9
3	control		48 mujer	1	5,08	4,9	4,08	2,58		100	96,45	80,31	50,8
4	control		47 hombre	1	2,92	2,84	2,38	1,76		100	97,26	81,5	60,27
5	control		47 mujer	1	5,875	4,875	3,375	2,375		100	82,9	57,44	40
6	control		67 hombre	1	8,5	7,6	7,25	4,4		100	89,4	85,3	51,76
7	control		75 mujer	1	3,14	3,07	2,07	1,14		100	97,7	65,93	36,3
8	control		64 mujer	1	3,2	3,13	2,73	0,87		100	97,8	85,3	27,2
9	control		43 mujer	1	5,25	4,75	4,38	2,63		100	90,5	83,43	50,1
10	control		69 mujer	1	3,64	2,86	2,92	2,28		100	78,6	80,22	62,63
11	control		68 hombre	1	2,64	2,57	2,42	1,78		100	97,35	91,7	67,42
12	control		58 mujer	1	6,7	6,57	6	4,42		100	98	89,6	66
13	control		51 hombre	1	2,58	2,63	2,1	1,7		98	100	79,85	64,64
14	control		48 hombre	1	2,08	1,83	1,58	1,25		100	88	76	60
15	control		72 mujer	1	3,75	3,25	2,5	1,37		100	86,6	66,6	36,5
16	control		78 mujer	1	1,05	1,26	1,1	1,05		83,3	100	87,3	83,3
17	control		32 mujer	1	3,42	4,14	4,14	3,71		82,6	100	100	89,6
18	control		74 mujer	1	2,6	2,73	1,87	1,1		95,2	100	68,5	40,3
19	control		64 mujer	1	6,2	4,4	1,8	1,8		100	71	29	29
20	control		44 hombre	1	4	3,077	2,61	1,92		100	76,92	65,25	48
21	ela		54 hombre	1	1,8	3,4	2,4	1		52,9	100	70,6	29,4
22	ela		44 mujer	1	6,28	6,7	5,85	3,28		93,73	100	87,3	49
23	ela		78 hombre	1	4	2,14	2	1,14		100	53,5	50	28,5
24	ela		64 hombre	1	6,5	6	3,89	2,45		100	92,3	59,8	37,7
25	ela		61 hombre	1	2,42	2,83	2,08	1,5		85,5	100	73,5	53
26	ela		64 hombre	1	3,33	4,08	3,33	1,83		81,6	100	81,6	44,85
27	ela		69 hombre	1	4,2	5,67	4,44	2,33		74	100	78,3	41,1
28	ela		67 hombre	1	3,71	5,07	4,21	2,78		73,17	100	83,04	54,83
29	ela		71 mujer	1	3,78	4,55	3,22	2,11		83	100	70,77	46,4
30	ela		59 hombre	1	1,8	2,42	2,42	2,42		74,38	100	100	100
31	ela		59 mujer	1	3,83	2,16	1,33	1,5		100	56,39	34,73	39,2
32	ela		78 mujer	1	5,2	5,33	4,13	2		97,56	100	77,5	37,5
33	ela		66 hombre	1	4	4,78	4,44	2,67		83,7	100	92,9	55,86
34	ela		64 mujer	1	4,2	4,1	2,89	1		100	97,61	68,8	23,8
35	ela		38 hombre	1	3,89	3,67	1	1		100	94,34	25,7	25,7
36	ela		70 hombre	1	3,67	5,11	4,6	2,6		71,82	100	90	50,89
37	ela		80 hombre	1	2,35	2,6	2,11	1,82		90,38	100	81,15	70
38	ela		34 hombre	1	3,06	3,43	3,25	2,06		89,2	100	94,75	60
39	ela		76 hombre	1	3,44	3,89	2,56	2,11		88,43	100	65,8	54,24
40	ela		65 hombre	1	2,83	1,83	1,33	1,16		100	64,66	47	41
41	ela		77 hombre	1	2,25	3,25	2,62	2,37		69,23	100	80,6	72,92
42	ela			1									

Tabla 2. Resultados de lactato a los diferentes tiempos: basal, minuto 1, 3, 5 y 10.

Hecho esto, antes de continuar con el estudio, he pasado el filtro o *screening* del amonio. El amonio aumenta de 5 a 10 veces el valor basal con el ejercicio, con un pico máximo a los 2-5 minutos. Esto nos sirve para controlar la intensidad del ejercicio y de esta manera para constatar la correcta realización del test de isquemia. Entonces, aquellos pacientes quienes no han dado los resultados dentro de estos márgenes teóricos han sido eliminados del estudio, con el fin de evitar resultados erróneos. **(Tabla 3).**

Finalmente, mi muestra de participantes al estudio se ha reducido a 11 pacientes y 13 controles (**Tablas 4 y 5**). Con los resultados de todos ellos he podido calcular el valor del promedio, la desviación estándar y el error para así proceder a realizar los siguientes gráficos para plasmar los valores obtenidos.

He recurrido al software de estadísticas epidemiológicas OpenEpi para conocer los datos estadísticos necesarios. He utilizado una tabla 2x2 y el Test *t*. La primera se utiliza para evaluar la asociación entre un posible factor de riesgo y un resultado. Las estadísticas producidas incluyen las pruebas de Fisher y Mid-p exactsm Chi-cuadrado, Odds ratio, cálculos de Odds ratio de probabilidad máxima, razón de riesgo/prevalencia (riesgo relativo), diferencia de riesgo y fracciones etiológicas con límites de confianza calculados por varios métodos con análisis estratificado. El *t-student* compara las medias de dos muestras independientes. Con el intervalo de confianza deseado, el tamaño de la muestra, la media y la desviación estándar (o error estándar) de cada grupo de muestra, se prueba la diferencia significativa entre dos medias de muestra. También se visualiza la diferencia media con el intervalo de confianza.

CÓDIGO	ENFERMEDA	EDAD	SEXO	TIEMPO 0	LA TIEMPO 1	LA TIEMPO 3	LA TIEMPO 5	LA TIEMPO 10	LACTATO (Δ)	%max t=0	%max t=1	%max t=3	%max t=5	%max t=10
16-107	ela	64	hombre	1	3,33	4,08	3,33	1,83		24,51	81,6	100	81,6	44,85
16-110	ela	44	hombre	1	4	3,08	2,61	1,92		25	100	76,92	65,25	48
16-122	ela	44	mujer	1	6,28	6,7	5,85	3,28		14,93	93,73	100	87,3	49
16-202	ela	64	hombre	1	6,5	6	3,89	2,45		15,38	100	92,3	59,8	37,7
16-241	ela	69	hombre	1	4,2	5,67	4,44	2,33		17,64	74	100	78,3	41,1
16-256	ela	67	hombre	1	3,71	5,07	4,21	2,78		19,72	73,17	100	83,04	54,83
16-564	ela	59	hombre	1	1,8	2,42	2,42	2,42		41,32	74,38	100	100	100
16-348	ela	70	hombre	1	3,67	5,11	4,6	2,6		19,56	71,82	100	90	50,89
17-049	ela	80	hombre	1	2,35	2,6	2,11	1,82		38,63	90,38	100	81,15	70
17-058	ela	34	hombre	1	3,06	3,43	3,25	2,06		29	89,2	100	94,75	60
15-082	ela	64	mujer	1	3,79	4,07	1,83	1,42		24,3	93,21	100	45,15	34,9

Tabla 4. Resultados de lactato de los pacientes a los diferentes tiempos: basal, minuto 1, 3, 5 y 10.

CÓDIGO	ENFERMEDA	EDAD	SEXO	TIEMPO 0	LA TIEMPO 1	LA TIEMPO 3	LA TIEMPO 5	LA TIEMPO 10	LACTATO (Δ)	%max t=0	%max t=1	%max t=3	%max t=5	%max t=10
16-123	control	47	mujer	1	5,88	4,88	3,37	2,37		17,02	100	82,9	57,44	40
15-089	control	50	mujer	1	3,06	2,67	2,4	0,67		32,6	100	100	78,43	21,9
16-235	control	48	mujer	1	5,08	4,9	4,08	2,58		19,67	100	96,45	80,31	50,8
16-109	control	47	hombre	1	2,92	2,84	2,38	1,76		34,2	100	97,26	81,5	60,27
16-195	control	67	hombre	1	8,5	7,6	7,25	4,4		11,7	100	89,4	85,3	51,76
16-211	control	75	mujer	1	3,14	3,07	2,07	1,14		31,8	100	97,7	65,93	36,3
16-203	control	64	mujer	1	3,2	3,13	2,73	0,87		31,25	100	97,8	85,3	27,2
16-242	control	43	mujer	1	5,25	4,75	4,38	2,63		19,05	100	90,5	83,43	50,1
16-255	control	69	mujer	1	3,64	2,86	2,92	2,28		27,45	100	78,6	80,22	62,63
16-565	control	58	mujer	1	6,7	6,57	6	4,42		14,89	100	98	89,6	66
16-624	control	51	hombre	1	2,58	2,63	2,1	1,7		38	98	100	79,85	64,64
17-111	control	32	mujer	1	3,42	4,14	4,14	3,71		25,45	82,6	100	100	89,6
17-110	control	74	mujer	1	2,6	2,73	1,87	1,1		34,58	95,2	100	68,5	40,3

Tabla 5. Resultados de lactato de los controles a los diferentes tiempos: basal, minuto 1, 3, 5 y 10.

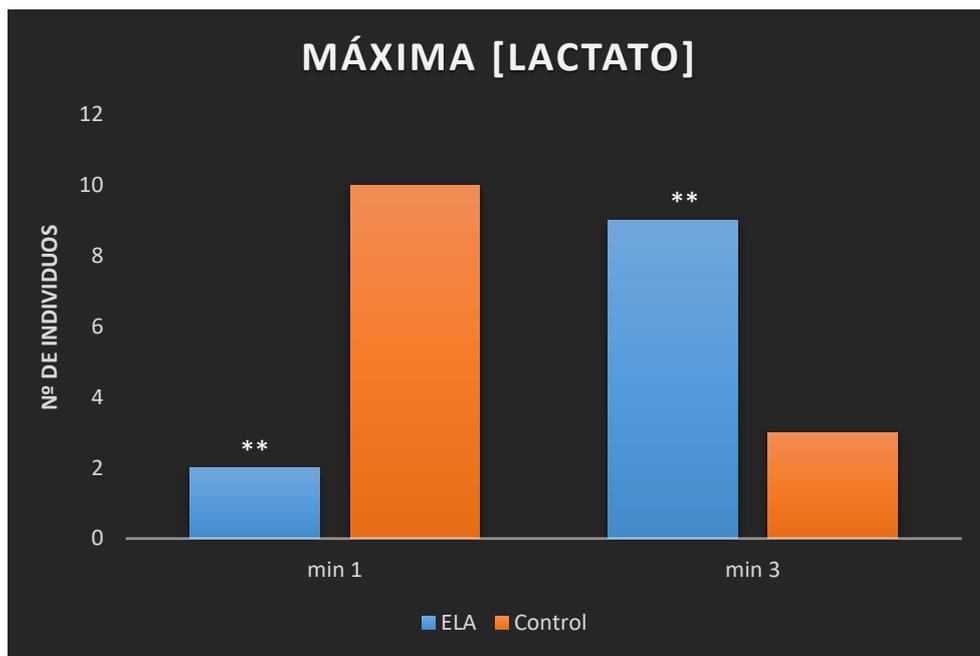


Figura 5. Representación de número de individuos que obtienen el pico máximo de lactato en los minuto 1 y 3. Al minuto 1, 2 pacientes y 10 controles. Al minuto 3, 9 pacientes y 3 controles. $p < 0,05$ ().**

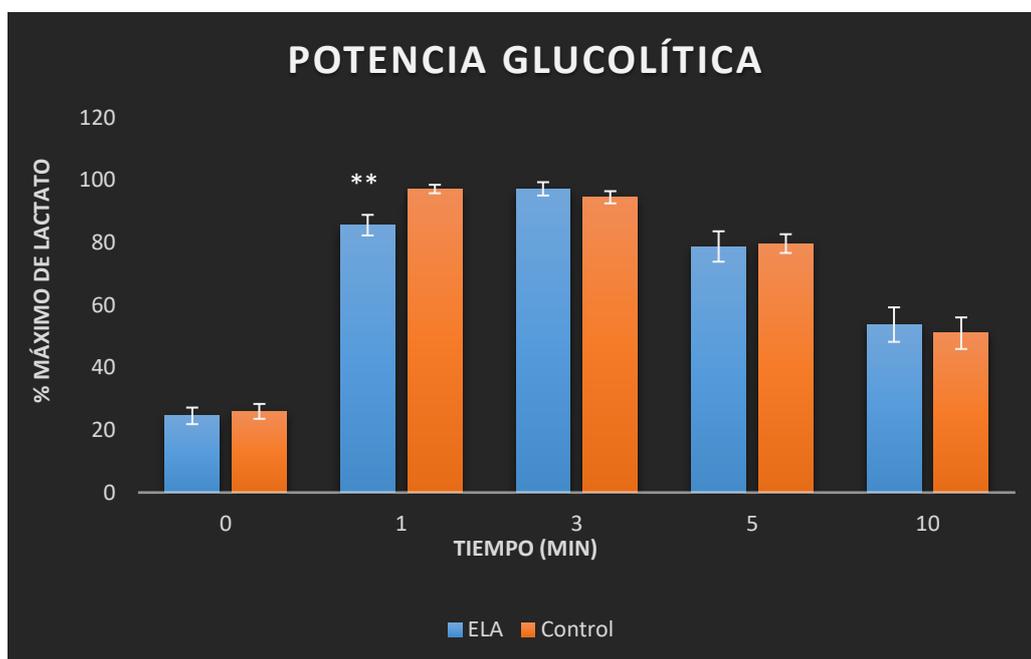


Figura 6, Representación del porcentaje respecto a la máxima concentración de lactato a cada tiempo. En el minuto 1, ambos pacientes y controles han ascendido la concentración de lactato respecto al minuto 0, pero el % máximo es mayor en el grupo de los controles que en el de los pacientes. En el minuto 3 en cambio, ya se ve un ligero descenso de los pacientes mientras que el grupo de la ELA sigue ascendiendo. Luego el valor promedio de los porcentajes de los pacientes es mayor en el minuto.

5.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.1.1. Tabla 2X2

Análisis de tabla simple

	Enfermedad		
	(+)	(-)	
Exposición (+)	2	9	11
Exposición (-)	10	3	13
	12	12	24

Medidas de Asociación exactas y chi cuadrado

Prueba	Valor	Valor-p (1-cola)	Valor-p (2-cola)
Chi cuadrado sin corrección	8.224	0.002067	0.004135
Chi cuadrado corregida de Yates	6.042	0.006985	0.01397
Chi cuadrado de Mantel-Haenszel	7.881	0.002498	0.004995
Exacto de Fisher		0.006139(P)	0.01228
Mid-p exacto		0.003231(P)	0.006461

Todos los valores esperados (total de la filas * total de columnas/total) son ≥ 5
 Aceptar para chi cuadrado

Estimador basado en el riesgo* e Intervalos de confianza al 95%

No válido para estudios de casos-control

Cálculos de puntos	Límites de confianza			
	Tipo	Valor	Inferior, Superior	Tipo
Riesgo en Expuestos		18.18%	3.987, 48.85	Series de Taylor
Riesgo en NoExpuestos		76.92%	49.06, 92.5	Series de Taylor
Riesgo Total		50%	31.43, 68.57	Series de Taylor
Razón de Riesgo		0.2364	0.06517, 0.8573 ¹	Series de Taylor
Diferencia de Riesgo		-58.74%	-91.05, -26.43 ^o	Series de Taylor
Fracción prevenible pob.(fpp)		35%	4.73, 50	
Fracción prevenible en expuestos (fpe)		76.36%	14.27, 93.48	

Cuando algún valor de los grupos en la tabla 2x2 es menor de 5, se escoge a escala Fisher, que es más estricta. Me aparecen todas las estadísticas o medidas de asociación posibles pero en nuestro caso el exacto de Fisher es lo más correcto. Entonces con un valor p de 0,01228 tenemos una diferencia significativa con un valor $p < 0,05$. Cogemos el valor de las 2 colas porque es siempre más exacto en cuanto a la estadística, ya que de esta manera el 5% de la estadística se divide en dos colas, evitando incluir una de las colas en el conjunto del 95%.

5.1.2. t-student

Min 1

Intervalo de confianza de dos lados		95%				
	Tamaño de la muestra	Media	Desv. Std.	Error Std.		
Grupo-1	11	85.59	10.93			
Grupo-2	13	97.15	4.87			

<u>Resultado</u>	<i>t</i> estadísticas	<i>df</i>	valor-p ¹	Diferencia de medias	Límite inferior	Límite superior
Varianza igual	-3.4412	22	0.002330	-11.56	-18.5267	-4.59328
Varianza desigual	-3.24575	13	0.006380	-11.56	-19.2543	-3.86571

Prueba para igualdad de varianzas ²	Estadísticas <i>F</i>	<i>gl</i> (numerador, denominador)	valor-p ¹
	5.03712	10,12	0.01041

Min 3

Intervalo de confianza de dos lados		95%				
	Tamaño de la muestra	Media	Desv. Std.	Error Std.		
Grupo-1	11	97.2	7.11			
Grupo-2	13	94.51	7.04			

<u>Resultado</u>	<i>t</i> estadísticas	<i>df</i>	valor-p ¹	Diferencia de medias	Límite inferior	Límite superior
Varianza igual	0.928492	22	0.3632	2.69	-3.31835	8.69835
Varianza desigual	0.927692	21	0.3641	2.69	-3.34018	8.72018

Prueba para igualdad de varianzas ²	Estadísticas <i>F</i>	<i>gl</i> (numerador, denominador)	valor-p ¹
	1.01999	10,12	0.9597

Min 5

Intervalo de confianza de dos lados		95%		
	Tamaño de la muestra	Media	Desv. Std.	Error Std.
Grupo-1	11	78.75	16.15	
Grupo-2	13	79.68	10.81	

Resultado	testadísticas	df	valor-p ¹	Diferencia de medias	Limite inferior	Limite superior
Varianza igual	-0.168135	22	0.8680	-0.93	-12.4011	10.5411
Varianza desigual	-0.162633	17	0.8727	-0.93	-12.9948	11.1348

	Estadísticas <i>F</i> <i>gl</i> (numerador, denominador)	valor-p ¹
Prueba para igualdad de varianzas ²	2.232 10,12	0.1890

Min 10

Intervalo de confianza de dos lados		95%		
	Tamaño de la muestra	Media	Desv. Std.	Error Std.
Grupo-1	11	53.75	18.33	
Grupo-2	13	51	18.21	

Resultado	testadísticas	df	valor-p ¹	Diferencia de medias	Limite inferior	Limite superior
Varianza igual	0.367522	22	0.7167	2.75	-12.7678	18.2678
Varianza desigual	0.367312	21	0.7171	2.75	-12.8197	18.3197

	Estadísticas <i>F</i> <i>gl</i> (numerador, denominador)	valor-p ¹
Prueba para igualdad de varianzas ²	1.01322 10,12	0.9683

Como se puede apreciar en las gráficas, hay cierta diferencia de los valores máximos del lactato en el tiempo entre los pacientes y los controles. En la primera, vemos que 10 de los 13 controles y 2 de los 11 pacientes obtienen el pico del lactato al minuto 1 tras realizar el ejercicio anaeróbico, mientras que 3 de los 13 controles y 9 de los 11 pacientes lo logran al minuto 3. En la segunda, en cambio, comparamos la elevación de los niveles de lactato en ambos grupos en cada instante y se ve claramente que el pico máximo del lactato se da en el minuto 1 para los controles y en el minuto 3 para los pacientes.

Hemos obtenido un resultado significativo en que los pacientes con ELA tienen un metabolismo del lactato enlentecido. Aunque se consigue multiplicar el nivel del lactato basal entre 4 y 6, este resultado, el pico del lactato, aparece más tarde que en los experimentos de control, lo cual nos confirma un defecto glucolítico en los pacientes con ELA que podría manifestarse en un activación retardada de esta vía cuando se fuerza su uso como mayoritaria fuente de energía.

6. DISCUSIÓN

Clásicamente se ha considerado que el cuadro de afectación neuromuscular que padecen los enfermos por la Esclerosis Lateral Amiotrófica es una consecuencia de la denervación. Se estima que la enfermedad afecta primariamente a la motoneurona, cuya denervación del musculo origina la clínica subsiguiente: rigidez, hiperreflexia, fasciculaciones, atrofia muscular, etc. Hasta ahora se ha planteado la hipótesis en el que uno de los factores etiológicos de la ELA podría ser el estrés oxidativo. Un ambiente en esta situación crónica, junto con otros factores etiológicos y fisiopatológicos de la ELA vistos anteriormente, conduciría a la degeneración y muerte de la neurona motora. Sin embargo, existen algunas evidencias tanto clínicas como experimentales que pueden sugerir que el proceso degenerativo podría funcionar de manera inversa (Dupuis et al., 2003).

En este estudio hemos encontrado una evidencia sobre una alteración a nivel metabólico anaerobio en los pacientes con ELA. La prueba de ejercicio isquémico en el antebrazo ha mostrado que una gran proporción de enfermos presentan un retraso en el pico de producción de lactato tras el ejercicio, por lo que se concluye un defecto glucolítico muscular en condiciones anaeróbicas. Este retraso en el pico es el resultado de una disminución de la velocidad en las diferentes reacciones enzimáticas de la glucolisis, ya sea por una deficiencia genética en las enzimas glucolíticas, o por factores ambientales que modifiquen de alguna forma la funcionalidad de dichas enzimas.

Es un punto destacable que en recientes estudios se ha visto que algunas glucogenosis, la enfermedad de Pompe entre otras, generan a la larga alteraciones a nivel del SNC (Burrow et al, 2010). Siendo errores congénitos del metabolismo del glucógeno, acaban afectando de alguna manera a la funcionalidad neural. No son muchos años desde que se empezó a tratar este tipo de enfermedades, luego anteriormente los pacientes fallecían a causa del acumulo glucogénico en el musculo; sobre todo en el miocardio o en el diafragma. Sin embargo, desde que se hace uso de la terapia de reemplazo enzimático esta afectación se mejora prolongando claramente la supervivencia del paciente. Es entonces cuando se ha visto que la enfermedad además de generar un daño muscular, perjudica al sistema nervioso. Esto nos hace plantear un

posible mecanismo metabólico común de afectación más agresiva y más temprana en la ELA por la ausencia de tratamiento efectivo que alargue la esperanza de vida.

La repercusión que podría tener un fallo metabólico muscular en la denervación como punto patológico clave en la ELA, es un hecho hasta ahora desconocido. Los mecanismos moleculares por los que dicha deficiencia muscular afectarían a la viabilidad de la motoneurona debería ser investigado más profundamente.

Puede existir la posibilidad de que el lactato muscular, como ocurre en los astrocitos a nivel del sistema nervioso central, sea bombeado hacia la motoneurona en un transporte dependiente de ATP, con lo cual el lactato estaría implicado en la señalización de la motoneurona. De esta manera, el metabolismo muscular jugaría un papel importante y complementario en el mantenimiento del axón, luego al presentar una alteración a este nivel, se dañaría la motoneurona desde el botón sináptico de manera ascendente, conocido como el fenómeno de *dying-back* (Dadon-Nachum et al, 2011).

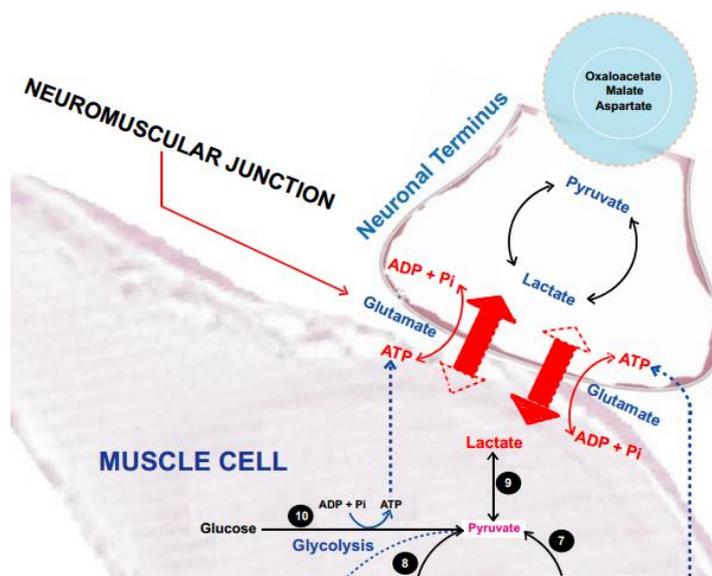


Figura 7, Representación del transporte del lactato dependiente de ATP en la unión neuromuscular. Tomado de Vadakkadat et al., 2012.

Esto podría explicar la denervación muscular en la ELA de manera inversa de cómo se ha descrito hasta ahora. En este caso, sería el miocito quién a través de un déficit metabólico dañara el axón de la motoneurona. Sin embargo, con los resultados obtenidos en este estudio no se puede confirmar totalmente dicha hipótesis.

Además, el déficit de aporte energético podría generar a la larga un estado hipercatabólico compensador de estos pacientes. Es conocido que cuando los niveles de ATP muscular descienden, el organismo responde con una activación fisiológica de las vías catabólicas por el glucagón y la adrenalina. La primera actúa a nivel hepático con la finalidad de aumentar la cantidad de glucosa en sangre a través de la glucogenolisis y la gluconeogénesis. La adrenalina, en cambio, con la misma finalidad de aumentar la producción de la glucosa, activa la lipólisis. De esta manera, se genera una pérdida de la grasa y una mayor concentración de ácidos grasos en la circulación periférica, lo cual podría explicar la alta prevalencia de hígado graso en este tipo de pacientes. Este ejemplo es uno de los múltiples efectos nocivos que genera el estado hipercatabólico característico en pacientes con ELA.

Todas estas evidencias apoyan una posible reinterpretación de la fisiopatología de la ELA, y de la misma manera nos ofrecen nuevas dianas terapéuticas en cuanto a su tratamiento. En consecuencia, las anomalías metabólicas que se hallan en estas personas son posibles mecanismos a través de los cuales se podría modificar la enfermedad. Las estrategias para corregir o compensar el desequilibrio energético podrían beneficiar a la funcionalidad neuronal y, por lo tanto, mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los enfermos que viven con ELA.

Para finalizar, como síntesis de este trabajo, se podría afirmar que estas conclusiones nos ofrecen un punto de vista muy diferente de la ELA respecto a la que se ha considerado hasta hoy. Además, a pesar de la extensa lista de pruebas farmacológicas, apenas se han logrado fármacos que hayan tenido algo de impacto en la supervivencia de estos pacientes. No obstante, van apareciendo nuevas evidencias en cuanto a la causa y por lo tanto, diana terapéutica de la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Esto nos brinda la posibilidad de investigar sobre una nueva estrategia terapéutica que actúe a nivel neuromuscular, en el metabolismo muscular con la facilidad de que no tenga que pasar la barrera hematoencefálica.

7. CONCLUSIONES

1. La esclerosis lateral amiotrófica es resultado de un proceso multipaso en el que diversas mutaciones en diferentes genes y la exposición ambiental a determinados agentes tóxicos juegan un papel importante.
2. Los pacientes con ELA presentan un deterioro en la homeostasis energética, lo que genera en ellos un estado hipercatabólico.
3. El metabolismo anaerobio está enlentecido en la ELA, por lo que existe un defecto glucolítico en estos pacientes.
4. Las anomalías metabólicas que se encuentran en las personas con ELA son posibles mecanismos a través de los cuales se podría modificar la enfermedad.

8. BIBLIOGRAFIA

Ince PG, Lowe J, Shaw PJ, 1998. Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24, 104.

Gordon PH, Cheng B, Katz IB, Pinto M, Hays AP, Mitsumoto H, Rowland LP, 2006. The natural history of primary lateral sclerosis. *Neurology* 66, 647-653.

Hardiman O, Van den Berg LH, Kiernan MC, 2011. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 639-649.

Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC, 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377, 942-955.

Worms PM, 2001. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci* 191, 3.

Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E, 2010. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 385-390.

Jordan H, Rechtam L, Wagner L, Kaye WE, 2015. Amyotrophic lateral sclerosis surveillance in Baltimore and Philadelphia. *Muscle Nerve* 51, 815.

Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G, 2005. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain J Neurol.* 128, 472-476.

Chio A, Mora G, Calvo A, Mazzini L, Bottacchi E, Mutani R, 2009. Epidemiology of ALS in Italy: a 10-year prospective population-based study. *Neurology* 72, 725-731.

Joensen P, 2012. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the Faroe islands. *Acta Neurol. Scand.* 126, 62-66.

O'Toole O, Traynor BJ, Brennan P, Sheehan C, Frost E, Corr B, Hardiman O, 2008. Epidemiology and clinical features of amyotrophic lateral sclerosis in Ireland between 1995 and 2004. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 30-32.

Doble A, 1996. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 47.

Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V, 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis: ALS/Riluzole Study Group. *N. England J. Med.* 330, 585-591.

Shaw CE, Al-Chalabi A, Leigh N, 2001. Progress in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Neurol. Neurosci.* 1 (1), 69-76.

Oyanagi K, Yamazaki M, Takahashi H, Watabe K, Wada M, Komori T, Morita T, Mizutani T, 2008. Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34, 650-658.

Sasaki S, 2010. Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 346-355.

Zufiría M, Gil-Bea FJ, Fernández-Torrón R, Poza JJ, Muñoz-Blanco JL, Rojas García R, Riancho J, López de Munain A, 2016. ALS: a bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Progress in Neurobiology* 142, 104-129.

Al-Sarraj S, King A, Troakes C, Smith B, Maekawa S, Bodi I, Rogelj B, Al-Chalabi A, Hortobagyi T, Shaw CE, 2011. P62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTL and MND/ALS. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 122 (6), 691-702.

Ince PG, Highley JR, Kirby J, Wharton SB, Takahashi H, Strong MJ, Shaw PJ, 2011. Molecular pathology and genetic advances in amyotrophic lateral sclerosis: an emerging molecular pathway and the significance of glial pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 122, 657-671.

Debray S, Race V, Crabbe V, Herdewyn S, Matthijs G, Goris A, Dubois B, Thijs V, Robberecht W, Van Damme P, 2013. Frequency of C9orf72 repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis: a Belgian cohort study. *Neurobiol. Aging* 34 (2890) (e7-2890. e12).

Ratti A, Corrado L, Castellotti B, Del Bo R, Fogh I, Cereda C, Tiloca C, D'Ascenzo C, Bagrotti A, Pensato V, Ranieri M, Gagliardi S, Calini D, Mazzini L, Taroni F, Corti S, Ceroni M, Oggioni GD, Link K, Powell JF, Soraru G, Ticozzi N, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Silani V, SLAGEN Consortium, 2012. C9ORF72 repeat expansion in a large Italian ALS cohort: evidence of a founder effect. *Neurobio. Aging* 33, (2528. e7-2528, 14).

Al-Chalabi A, Calvo A, Chio A, Colville S, Ellis CM, Hardiman O, Heverin M, Howards RS, Huisman MHB, Keren N, Leigh PN, Mazzini L, Mora G, Orrell RW, Rooney J, Scott KM, Scotton WJ, Seelen M, Shaw CE, Sidle KS, Swingler R, Tsuda M, Veldink JH, Visser AE, Van den Berg, LH, Pearce N, 2014. Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study. *Lancet Neurol.* 13, 1108-1113.

Chen Y, 2012. Organophosphate-induced brain damage: mechanism, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. *Neurotoxicology* 33, 391-400.

Murch SJ, Cox PA, Banack SA, 2004b. a mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 12228-12231.

Horner RD, Grambow SC, Coffman CJ, Lindquist JH, Oddone EZ, Allen KD, Kasarskis EJ, 2008. Amyotrophic lateral sclerosis among 1991 Gulf War veterans: evidence for a time-limited outbreak. *Neuroepidemiology* 31 (1), 28-32.

Zhou H, Chen G, Chen C, Yu Y, Xu Z, 2012. Association between extremely low-frequency electromagnetic fields occupations and amyotrophic lateral sclerosis; a meta-analysis. *PLoS One* 7, e48354.

Huang YH, Shih CM, Huang CJ, Lin CM, Chou CM, Tsai ML, Liu TP, Chiu JF, Chen CT, 2006. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J. Cell Biochem.* 98, 577-589.

Nie CL, Wang XS, Liu Y Perrelet S, He RQ, 2007. Amyloid-like aggregates of neuronal tau induced by formaldehyde promote apoptosis of neuronal cells. *BMC Neurosci.* 8, 9.

Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Ozen OA, 2005. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. *J. Chem. Neuroanat.* 29, 173-178.

Beghi E, Logroscino G, Chio A, Hardiman O, Millul A, Mitchell D, Swingler R, Traynor BJ, 2010. Amyotrophic lateral sclerosis, physical exercise, trauma and sports: results of a population-based pilot case-control study. *Amyotroph Lateral Scler.* 11, 289-292.

Beghi E, 2013. Are professional soccer players at higher risk of ALS? *Amyotroph Lateral Scler. Frontotemporal Degener* 14, 501-506.

Fang F, Hallmarker U, James S, Ingre C, Michaelsson K, Ahlbom A, Feychting M, 2015. Amyotrophic lateral sclerosis among cross-country skiers in Sweden. *Eur. J. Epidemiol.*

Gotkine M, Friedlander Y, Hochner H, 2014. Triathletes are over-represented in a population of patients with ALS, *Amyotroph Lateral Scler, Frontotemporal Degener* 15, 534-536.

Pupillo E, Messina P, Giussani G, Logroscino G, Zoccolella S, Chio A, Calvo A, Corvo M, Lunetta C, Marin B, Mitchell D, Hardiman O, Rooney J, Stevic Z, Bandettini di Poggio, M, Filosto M, Cotelli MS, Perini M, Riva N, Tremolizzo L, Vitelli E, Damiani D, Beghi E, 2014. Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: a European population-based case-control study. *Ann. Neurol.* 75, 708-716.

Wang T, Jiang X, Lei XG, 2012. Knockout of SOD1 alters murine hepatic glycolysis, gluconeogenesis and lipogenesis. *Free Radic. Bio. Med.* 53, 1689-1696.

Dodge JC, Treleaven CM, Fidler JA, Tamsett TJ, Bao C, Searles M, Taksir TV, Misra K, Sidman RL, Cheng SH, Shihabuddin LS, 2013. Metabolic signatures of amyotrophic lateral sclerosis reveal insights into disease pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 10812-10817.

Chiang PM, Ling J, Jeong YH, Price DL, Aja SM, Wong PC, 2010. Deletion of TDP-43 down-regulates *Tbc1d1*, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16320-16324.

Perera ND, Sheean RK, Scott JW, Kemp BE, Horne MK, Turner BJ, 2014. Mutant TDP-43 deregulates AMPK activation by PP2A in ALS models. *PLoS One* 9, e95549.

Moriwaka F, Tashiro K, Shima K, Hamada T, 1993. Glucagon and ALS. *Neurology* 43, 1061.

Nodera H, Takamatsu N, Muguruma N, Ukimoto K, Nishio S, 2015. Frequent hepatic steatosis in amyotrophic lateral sclerosis: implication for systemic involvement. *Neurol. Clin. Neurosci.* 3, 58-62.

Goto F, Kitamura A, Koto A, Kataoka K, Atsuji H, 1972. Abnormal insulin secretion in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 16, 201-207.

Den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA, 2004. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome: lessons from animal models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 644-649.

Desport JC, Preux PM, Magy L, Boirie Y, Vallat JM, Beaufriere B, Couratier P, 2001. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 328-334.

Desport JC, Torny F, Lacoste M, Preux PM, Couratier P, 2005. Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegener. Dis.* 2, 202-207.

Dupuis L, Pradat P-F, Ludolph AC, Loeffler J-P, 2011. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 10 (1), 75-82.

Huisman MHB, Seelen M, Van Doormaal PTC, de Jong SW, De Vries JHM, Van der Kooij AJ, De Visser M, Schelhass J, Van den Berg LH, Veldink JH, 2015. Effect of presymptomatic body mass index and consumption of fat and alcohol on amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol.* 72 (10), 1155-1162.

Pradat PF, Bruneteau G, Munerati E, Salachas F, Le Forestier N, Lacomblez L, Lenglet T, Meininger V, 2009. Extrapiramidal stiffness in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Mov. Disord.* 24 (14), 2143-2148.

Sanjak M, Paulson D, Sufit R, Reddan W, Beaulieu D, Erickson L, Shug A, Brooks BR, 1987. Physiologic and metabolic response to progressive and prolonged exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 37, 1217-1220.

Mcardle B, Verel D, 1956. Responses to ischaemic work in the human forearm. *Clinical Science* 15 (2), 305-318.

Munsat TL, 1970. A standardized forearm ischemic exercise test. *Neurology* 20 (12), 1171-1178.

Dupuis L, Oudart H, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP, 2004. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11159-11164.

Burrow TA, Bailey LA, Kinnett DG, Hopkin RJ, 2010. Acute progression of neuromuscular findings in infantile Pompe disease. *Pediatric neurology*, 42(6), 455-458.

Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D, 2011. The “dying-back” phenomenon of motor neurons in ALS. *J. Mol. Neurosci.* 43 (3), 470-477.