



REVISIÓN

La citotoxicidad del líquido cefalorraquídeo en la esclerosis lateral amiotrófica

J. Matías-Guiu^{a,*}, L. Galán^a, R. García-Ramos^a, J.A. Barcia^b y A. Guerrero^a

^a Servicio de Neurología, Instituto de Neurociencias, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^b Servicio de Neurocirugía, Instituto de Neurociencias, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

Recibido el 21 de diciembre de 2009; aceptado el 21 de enero de 2010

Accesible en línea el 23 Junio 2010

PALABRAS CLAVE

Esclerosis lateral amiotrófica;
Líquido cefalorraquídeo;
Citotoxicidad;
Cultivos celulares

Resumen

Introducción: La citotoxicidad del líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica en cultivos celulares que incluyen neuronas puede plantearse como un mecanismo de difusión de la enfermedad, debido a la cercanía del LCR a la médula espinal.

Desarrollo: Los diferentes estudios de la literatura indican una mayor susceptibilidad del efecto citotóxico en las motoneuronas, frente a otro tipo de células neuronales y la inclusión de glía en los cultivos. La revisión de la composición del LCR en la esclerosis lateral amiotrófica no permite indicar mediante qué mecanismo se producen cambios preapoptóticos y apoptóticos con la adición del LCR a los cultivos, aunque podría estar relacionado con los receptores del glutamato, en mayor medida, aquellos que responden a AMPA/kainato, e intervenir en canales iónicos.

Conclusiones: La citotoxicidad del LCR es una singularidad de la esclerosis lateral amiotrófica que podría explicar aspectos evolutivos de la enfermedad. Para el mejor conocimiento de este mecanismo, es necesario que nuevos estudios incluyan una mayor identificación de los pacientes de quienes se obtienen las muestras, así como sus características, y diferenciar si son formas familiares o esporádicas.

© 2009 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Lateral amyotrophic sclerosis;
Cerebrospinal fluid;

Cerebrospinal fluid cytotoxicity in lateral amyotrophic sclerosis

Abstract

Introduction: The cytotoxicity of cerebrospinal fluid (CSF) in patients with lateral amyotrophic sclerosis in cell cultures that include neurons may be considered as a diffusion mechanism of the disease, due to the proximity of the CSF to the spinal column.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: inc.hcsc@salud.madrid.org (J. Matías-Guiu).

Cytotoxicity;
Cell cultures

Development: Various literature studies suggest that the motor neurons are more susceptible to cytotoxicity compared to other neuron cells, including glial, in cell cultures. The review of the composition of CSF in lateral amyotrophic sclerosis gives few clues on how this mechanism causes pre-apoptotic and apoptotic changes on the addition on CSF to the cultures, although it could be associated with the glutamate receptors, to a greater extent in those that respond to AMPA/kainate, and have a role in ion channels.

Conclusions: The cytotoxicity of CSF is a peculiarity of lateral amyotrophic sclerosis, which could explain some aspects of how the disease progresses. More studies are required in order to understand more about this mechanism, including better identification of patients from whom samples are obtained, as well as their characteristics, differentiating them into familial or sporadic.

© 2009 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La posibilidad de que los materiales biológicos procedentes de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA), tanto en su forma familiar como esporádica, presenten algún tipo de elemento capaz de causar un efecto tóxico fue descrita ya por diferentes autores, que muestran mayor citotoxicidad con suero¹⁻⁴ o cambios bioquímicos o ultraestructurales en cultivos celulares^{5,6}, aunque otros estudios posteriores no pudieron confirmar estos efectos⁷⁻¹¹. También se ha propuesto la toxicidad del líquido cefalorraquídeo (LCR) en otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, donde se ha apuntado a que el LCR de estos pacientes pudiera inhibir el crecimiento de neuronas dopaminérgicas en cultivo¹²⁻¹⁶, aunque estos estudios no han sido reproducidos. Sin embargo, se ha descrito repetidamente el potencial efecto nocivo del LCR de pacientes con ELA (LCR-ELA) en distintos cultivos celulares¹⁷⁻³², aunque algún estudio no lo ha encontrado³³. Así, Iwasaki et al³⁴, en cultivo celular procedente del asta anterior de médula espinal en ratas embrionarias, no muestran diferencias en la supervivencia producida por LCR-ELA o en los controles y Gredal et al³⁵, en un cultivo de neuronas corticales de ratón, tampoco observan diferencias en la respuesta al calcio o al cloruro potásico al LCR-ELA, lo que indica que no se modifica la homeostasis del calcio, que es uno de los mecanismos de la lesión de mecanismo excitotóxico.

Contrariamente a estos pocos estudios negativos, un número importante de experimentos confirman el efecto citotóxico del LCR-ELA en diversos cultivos celulares (tabla 1). Este efecto tóxico es mayor en cultivos de neuronas motrices que en las que no lo son²⁸ y cuando en el cultivo hay mayor porcentaje de glía²⁸ que aquellos que incluyen mayoritariamente neuronas²⁹. El efecto deletéreo del LCR-ELA también puede estar mediado por microglía²⁵, pero Anneser et al²⁹ han demostrado el efecto citotóxico en cultivos con un porcentaje muy bajo de estas células. La tabla 2 muestra los estudios que evidencian cambios ultraestructurales producidos por LCR-ELA en las células como incremento en la fosforilación de los neurofilamentos^{18,19,26}, astrocitosis^{21,26,27}, vacuolización^{28,31}, signos preapoptóticos o apoptóticos^{25,29,30} o signos de muerte celular²⁸.

Composición del LCR-ELA

El LCR contiene proteínas y fragmentos de proteínas descargadas por las células afectadas, que podrían servir de biomarcadores para las enfermedades neurodegenerativas³⁶⁻⁴¹. En el caso de la ELA, con independencia de la búsqueda de un marcador biológico, tiene interés tratar de determinar cuál es el mecanismo que le confiere este carácter tóxico sobre los cultivos celulares⁴². El factor tóxico podría producir la degeneración neuronal de forma directa²⁴ o bien ser un mediador de propagación de la lesión. La posibilidad de que en el LCR se encuentre un elemento causal es poco probable, pero no descartable, dado que se trata de una enfermedad en que se considera que su presentación puede estar influida por factores ambientales^{43,44}, y por ello, se ha tratado de buscar este factor, que algún autor lo ha denominado misterioso⁴².

Siempre se ha considerado el glutamato como el mejor candidato a justificar un efecto directo; por ello, diferentes estudios se han centrado en la investigación de aminoácidos neurotransmisores en LCR. Contrariamente, se ha encontrado que los valores de glutamato están disminuidos en los pacientes graves, los de aspartato son normales o elevados y los de glicina son variables; hay pacientes con valores altos y bajos, mientras que la concentración de GABA está elevada en pacientes con progresión moderada y avanzada⁴⁵. En un estudio de 17 pacientes no se detectaron valores altos de glutamato, aspartato, glicina o beta-N-metilamino-L-alanina⁴⁶. En otro estudio, los valores de glutamato, isoleucina, leucina, metionina y tirosina fueron normales, mientras que hubo un aumento de las concentraciones de serina, glutamina y alanina en pacientes de inicio espinal⁴⁷. Los valores de quinurénico, un antagonista endógeno de los receptores de AA, aparecieron significativamente elevados en los pacientes, y eran más altos en enfermos avanzados⁴⁸. Es por ello, que aunque se ha apuntado a una neurotoxicidad mediada por los receptores AMPA^{17,28} o NMDA²² del glutamato o a través de GTL1 astrocitario³¹ para explicar el efecto tóxico del LCR-ELA, no parece fácil de justificar por la composición del propio LCR. Por otra parte, ni Tikka et al²⁵ ni Anneser et al²⁹ han conseguido probar que el glutamato influya en éste. También se han analizado otros neurotransmisores

Tabla 1 Efecto tóxico del líquido cefalorraquídeo (LCR) en esclerosis lateral amiotrófica (ELA), en cultivos celulares.

Autor/año	Cultivo	Resultado
Courantier et al ¹⁷ , 1993	Neuronas de rata en cultivo	Supervivencia celular con LCR-ELA del 47% frente al 80% de los controles
Terro et al ²⁰ , 1996	Células corticales de rata	Incremento de la tasa de muerte neuronal de casi el triple sobre el control
Smith et al ²³ , 1998	Células VSC-4,1, que son células colinérgicas	Cuando el LCR contiene valores elevados de 4-hidroxinonal, un producto de peroxidación lipídica produce un incremento del 50% de la muerte celular; si tiene contenidos bajos, no hay incremento
Tikka et al ²⁵ , 2002	Células de médula espinal de rata embrionaria	Reducción de un 34% en supervivencia neuronal
Sen et al ²⁸ , 2005	Células de médula espinal de ratas embrionarias	En neuronas motrices, la supervivencia celular disminuyó un 50%, mientras que en motoneuronas y otras neuronas, un 20%
Anneser et al ²⁹ , 2006	Motoneuronas de médula espinal embrionarias de ave	Reducción de un 10% de la supervivencia celular
Anneser et al ²⁹ , 2006	Cultivo mixto de motoneuronas y glía de médula espinal embrionarias de ave	Reducción del 50% de la supervivencia celular. No se modifica con la adición de glutamato

Tabla 2 Cambios ultraestructurales o bioquímicos por el efecto tóxico del líquido cefalorraquídeo (LCR) en esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en cultivos celulares.

Autor/año	Cultivo	Resultado
Nagaraja et al ¹⁸ , 1994	Células de médula espinal embrionaria de una especie de aves	Aumento de neurofilamentos fosforilados
Rao et al ¹⁹ , 1995	Neuronas motoras espinales de ratas neonatales	Incremento en la fosforilación de neurofilamento en asta anterior pero no en asta posterior
Shahani et al ²¹ , 1998	Células espinales de ratas neonatales	Astrocitosis intensamente GFAP positivos en sustancias gris y blanca
Manabe et al ²² , 1999	Células espinales lumbares de rata	Aumento de células Fos positivas en asta posterior
Tikka et al ²⁵ , 2002	Células de médula espinal de rata embrionaria	Fragmentación del ADN y signos preapoptóticos y apoptóticos. Desfosforilación de neurofilamentos
Shahani et al ²⁶ , 2004	Administración en el LCR de ratas, y se analiza el tejido de la médula espinal	Aumento de LDH, de anticuerpos de NF fosforilados y de astrocitos reactivos
Anneser et al ²⁷ , 2004	Células gliales procedentes de embrión de ave	Aumento de la proliferación astrocitaria y la expresión de vimentina
Sen et al ²⁸ , 2005	Células de médula espinal de ratas embrionarias	Retracción neurítica, edema celular, vacuolización citoplasmática e incluso muerte celular. Elevación transitoria, pero pronunciada, de calcio en neuronas motrices y no motrices, aunque mayor en las motrices
Anneser et al ²⁹ , 2006	Motoneuronas de médula espinal embrionarias de ave	Fragmentación del ADN y signos preapoptóticos
Ramamohan et al ³⁰ , 2007	Neuronas motrices espinales de ratas neonatales	Fragmentación del aparato de Golgi en las neuronas por el LCR de ELA
Shobha et al ³¹ , 2007	Neuronas motrices espinales de ratas neonatales	Células vacuoladas a las 48 h. Disminución de la expresión de GLT-1 en astrocitos de sustancia gris, con normalidad de GLAST. Aumento de actividad LDH
Gunasekaran et al ³² , 2009	Neuronas motrices espinales de ratas neonatales	Disminución de la expresión de los canales de Nav1.6. Disminución de la expresión de los canales de Kv1.6

u hormonas. Así, en pacientes con afección moderada y avanzada, un ultrafiltrado de CSF contra AchE mostró que la actividad estaba disminuida⁴⁹. Los valores de sustancia P en el LCR están aumentados, especialmente en pacientes con una duración mayor de dos años y medio⁵⁰. El contenido de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) se halló elevado en el LCR de pacientes, mientras que el ácido homovanílico y la somatostatina fueron normales⁵¹. En otro estudio, las concentraciones de LCR de péptido vasoactivo intestinal (VIP) se hallaron disminuidas, mientras que las de colecistoquinina (CCK) y la molécula celular de adhesión neural (NCAM) fueron normales⁵². Los valores de adenosina en LCR están aumentados, pero no de neopterinina, en otro estudio⁵³. Los valores de prostaglandina E fueron altos en comparación con el grupo control, pero sin relación con el estado clínico, el tipo de ELA o la duración de la enfermedad⁵⁴, datos que reprodujo otro estudio⁵⁵. Los valores de T3 en LCR se han encontrado discretamente aumentados en un estudio, mientras que los de T4 eran normales⁵⁶. Los valores de CRF se han detectado disminuidos⁵⁷. La proteína S-100 está disminuida en el LCR en estos 20 pacientes⁵⁸, de forma similar a lo encontrado en suero⁵⁹. EL GMPc se ha encontrado disminuido en el LCR, pero sin correlacionar con el estado clínico⁶⁰, aunque otro estudio no halla esta alteración⁶¹.

Varios autores han propuesto la posibilidad de que el factor tóxico esté mediado por el metabolismo oxidativo^{20,31}. Diferentes estudios han analizado sus marcadores en el LCR. Así, se han determinado las concentraciones de las formas reducidas y oxidadas de la coenzima Q10 (CoQ10) y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en el LCR-ELA. Los porcentajes de ox-CoQ10 y 8-OHdG fueron mayores que en controles y estaban relacionados con la duración de la enfermedad. La ox-CoQ10 se correlacionó con 8-OHdG en ELA esporádica^{62,63}. La forma ox-CoQ10 ya se había observado en 20 pacientes con ELA esporádica en una serie⁶⁴, y sin aumento en otra serie de 30 pacientes con ELA⁶⁵. En un estudio donde se analizó en el LCR un conjunto de proteínas oxidativas, la capacidad antioxidante total por la reducción de Fe, la cifra de 4-hidroxinonal y la suma de nitritos y nitratos como indicadores de productos oxidantes, la capacidad de reducir Fe estaba disminuida en el LCR y el conjunto de proteínas oxidantes aumentadas en LCR y plasma, mientras que la suma de nitritos y nitratos, contrariamente a lo hallado en varones en otro estudio⁶⁶, y la cifra de 4-hidroxinonal eran similares a los controles⁶⁷, datos reproducidos en otro trabajo⁶⁸. Esta sustancia está aumentada en las muestras de LCR-ELA que producen mayor grado de efecto tóxico según Smith et al²³. Los valores de nitratos están aumentados en otro estudio en ELA esporádica⁶⁹. No se ha demostrado aumento en el LCR por HPLC en ELA de alfatocofenol (vitamina E)⁷⁰. Los valores de 3-nitroxitiroxina también están disminuidos⁷¹. Los metabolitos del óxido nítrico están altos y la actividad superóxido dismutasa (SOD) baja en ELA esporádica⁷². La eritropoyetina en el LCR está disminuida en la ELA, en comparación con pacientes con cefaleas tensionales y demencias^{73,74}; es menor en los pacientes con una progresión más rápida⁷⁵. El F-2 isoprostanos, que es un marcador de neurodegeneración oxidativa, está normal en ELA y aumentado en Alzheimer⁷⁶. La comparación de los valores de radical hidroxilo, ascorbato libre, la actividad SOD1 y SOD2 y 8-OHdG mostró que, en ELA familiar y esporádica, las concentraciones de

ascorbato y 8-OHdG en LCR eran mayores que en los controles, mientras que las actividades SOD eran menores. La concentración de cobre en ELA esporádica era mayor que en los controles⁷⁷.

Considerando que la fosforilación de los neurofilamentos es una de las observaciones demostradas en los cultivos celulares tras la adición de LCR-ELA^{18,19,26}, y más por su potencial uso como biomarcador, hay diferentes estudios que han analizado estas proteínas en el LCR, así como las que influyen en la agregación. Así, la determinación de proteína de neurofilamentos ligeros en LCR estuvo elevada en los pacientes, en comparación con los controles, y correlacionó inversamente con la evolución y la cifra era menor en las SOD-ELA familiar⁷⁸. Los valores de otra proteína de neurofilamentos, NfHSMI35, estuvieron elevados en la ELA y más que en pacientes con Alzheimer. Los valores de NfHSMI35 en LCR fueron más altos en los pacientes con inicio en motoneurona superior y en aquellos con evolución más rápida y no correlacionaron con los valores de la proteína tau. Rosengren et al⁷⁹ mostraron que la proteína de los filamentos estaba aumentada en LCR. En otro estudio los valores de tau en el LCR no se han encontrado aumentados en 18 pacientes⁸⁰. Otros autores encuentran, sin embargo, un valor de tau aumentado en el LCR de 20 pacientes con ELA esporádica, especialmente en las fases iniciales. La proteína beta-amiloide 42 está disminuida en la ELA, según un estudio, mientras que las proteínas tau y fosfo-tau son normales en el LCR⁸¹, lo que se reproduce en otro estudio⁸⁰. La determinación en LCR de NfHSMI35 ha sido 5 veces mayor en 69 pacientes con ELA que en controles y 10 veces mayor que en pacientes con Alzheimer, y es mayor en pacientes cuyo inicio es por lesión de motoneurona superior, y no correlaciona con los valores de tau en LCR, que también están aumentados⁸². En relación con la TDP-43 en LCR, no se han encontrado incrementos destacables en ELA⁸³ ni en degeneración lobular frontotemporal-ELA, aunque un estudio ha mostrado valores elevados en pacientes con ELA en estadios precoces, que disminuyen con la duración de la enfermedad⁸⁴.

La adición de LCR-ELA supone la aparición de cambios preapoptóticos o apoptóticos^{25,28,29,30} en los cultivos celulares. El LCR-ELA contiene marcadores relacionados con la apoptosis, como la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9), que en un estudio de 24 pacientes con ELA y 15 controles se demostró algo inferior en los casos, sin llegar a la significación estadística, con una tendencia a disminuir con la evolución⁸⁵. Los valores de MMP-2 y MMP-9 y del inhibidor de MMPS, TIMP2, fueron normales, mientras que los de TIMP1 estuvieron elevados en otro estudio⁸⁶. En la evaluación del citocromo C en el LCR de 40 pacientes con ELA, éste apareció disminuido en el 46% de los pacientes en comparación con los controles, y no hubo variación significativa en el suero ni relación con las características clínicas⁸⁷.

Shahani et al²⁴ han propuesto a la posibilidad de que pueda haber un mecanismo inmunitario que explique la toxicidad del LCR-ELA. Diferentes estudios han medido marcadores inmunitarios en el LCR de los pacientes con ELA. Así, la determinación de RANTES (una beta-quimiocina), quimioatrayente para linfocitos y monocitos, mostró valores más elevados en la ELA que en procesos neurológicos no inflamatorios⁸⁸. El ligando Flt3 es una citocina con actividad neurotrófica y antiapoptótica, que favorece la supervivencia

neuronal y se ha detectado significativamente elevada en la ELA⁸⁹. Se ha descrito un aumento del complemento de CD4 en LCR⁹⁰. Anticuerpos contra las células del asta anterior de la médula están en el LCR de la mayoría de los pacientes con ELA⁹¹, así como se han detectado anticuerpos contra estructuras de la glía y axones en el LCR de un alto porcentaje de pacientes, además de anticuerpos contra células⁹². Se han observado títulos aumentados de anticuerpos antigangliósidos GM1, AGM1 y sulfátidos en un porcentaje de pacientes con ELA⁹³. Los resultados sobre los valores de interleucina 6 en el LCR son discordantes, puesto que para algunos está elevada⁹⁴, mientras que otros estudios la han encontrado normal⁹⁵, aunque también se ha interpretado que ésta se eleva por la hipoxemia⁹⁶.

Gunasekaran et al³² han señalado el potencial efecto protector de determinados factores de crecimiento, como BDNF y CNTF. Las cifras de BDNF no están alteradas en la ELA, al contrario que las de GDNF, que están aumentadas⁹⁷. En relación con otros factores de crecimiento, se han hallado valores aumentados de proteína quimiotáctica de monocito 1 (MCP-1) en el LCR de pacientes con ELA, y disminuidos del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), aunque sin demostración significativa. La MCP-1 se correlaciona positivamente con la escala de Norris, según un estudio que propone que el índice MCP1/VEGF en LCR podría diferenciar la ELA de otras enfermedades neurodegenerativas⁹⁸. La MCP-1 está aumentada en otro trabajo⁹⁹. Las concentraciones del factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) y la MCP-1 en LCR están aumentadas en comparación con controles¹⁰⁰. Otro estudio, contrariamente, demuestra que los valores de VEGF en LCR están aumentados significativamente en enfermedades de larga duración y de inicio en extremidades¹⁰¹. No se ha encontrado correlación del VEGF con el grado de hipoxia, aunque sus cifras son altas en pacientes hipoxémicos¹⁰². Otro estudio encuentra una disminución de los valores de VEGF en las fases iniciales de la ELA¹⁰³. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) está reducido en el LCR de ELA, según un estudio¹⁰⁴. El factor de crecimiento transformador beta 1 puede proteger a las neuronas del daño oxidativo e inhibir la apoptosis; su valor en LCR se ha encontrado dentro de la normalidad, aunque ha aparecido elevado en pacientes de larga duración¹⁰⁵. Se ha observado una disminución significativa en el LCR de hormona del crecimiento, insulina e IGF1¹⁰⁶, así como de los valores de óxido nítrico, IGF 1 y 2, que aparecen como normales¹⁰⁷.

Discusión

El LCR se encuentra muy cercano a muchas de las lesiones patológicas que se desarrollan en la ELA, especialmente medulares. Es posible que por ello pueda visualizarse en él determinados cambios bioquímicos más fácilmente que en otras enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, ello no justifica que pueda haber en el LCR algún factor que genere procesos patológicos en modelos celulares inespecíficos. Esto apoyaría que en el mecanismo de desarrollo de la enfermedad puedan intervenir más factores ambientales que de susceptibilidad genética. Aunque clínicamente pueden ser similares, la ELA familiar, especialmente las formas relacionadas con SOD1, y la ELA esporádica pueden

tener mecanismos distintos¹⁰⁸ y una respuesta diferente al tratamiento, lo que podría explicar el reciente fracaso del ensayo clínico con minociclina^{109,110}, aunque puede haber otras justificaciones¹¹¹. Las formas familiares asociadas a SOD1 basan el modelo experimental de animal transgénico más usado en la investigación en la enfermedad¹¹². No es posible conocer si los distintos subtipos de ELA presentan una acción citotóxica diferente, ya que en pocos artículos se describe esta información^{23,25,32}. En el trabajo de Tikka et al²⁵ se incluyen LCR procedentes de 26 pacientes, 5, familiares-SOD1, por la mutación D90A; 5, familiares distintas de SOD1, y 16, esporádicas, sin diferencias entre los 3 grupos en cuanto a fragmentación del ADN o el grado de fosforilación de los neurofilamentos, lo que parece indicar que el comportamiento de los grupos en cuanto a citotoxicidad puede ser similar. Aunque algunos estudios parecen indicar que la citotoxicidad del LCR-ELA no se correlaciona con la duración de la enfermedad^{25,29}, la mayoría no describe esta información, por lo que no puede descartarse que el factor tóxico pueda aparecer o desaparecer en un momento de la evolución.

Un aspecto importante que considerar es la mayor o menor susceptibilidad de los cultivos celulares en los que se ha demostrado el efecto citotóxico, ya que la mayoría se constituye con células obtenidas de médula espinal, embrionarias o adultas, o corticales (tablas 1 y 2). En todo caso, parece que el efecto tóxico tendría una mayor afinidad por las motoneuronas²⁸ y que está potenciado por las células gliales en el cultivo²⁵. Esta observación es compatible con los datos de Clement et al¹¹³, que demostraron que para que se produzca degeneración neuronal en el modelo de ratón transgénico con mutación de la SOD1, es preciso que, junto con la acumulación de la SOD1 anómala en la neurona, haya participación de las células no neuronales, que podría ser a través de una alteración de las proteínas transportadoras de glutamato GTL1 y EAAT2¹¹⁴⁻¹¹⁷, lo que es uno de los argumentos a favor de la terapia celular en la enfermedad¹¹⁸. Tikka et al²⁵ han señalado que el efecto citotóxico podría estar mediado por la microglía, en consonancia con la hipótesis de Boillee et al¹¹⁹, aunque Anneser et al²⁹ lo encuentran en cultivos con escasa presencia de estas células.

El experimento de Anneser et al²⁹ señala que el factor tóxico debe tener un bajo peso molecular y ser resistente al calor. El análisis de la proteómica en LCR está representando un modelo de investigación en las enfermedades neurológicas^{120,121}, es idóneo para moléculas pequeñas y, por lo tanto, podría dar información adicional. En nuestro conocimiento, en la literatura sólo hay cuatro estudios de proteómica en el LCR en la ELA. Ramstrom et al¹²² no hallan ninguna proteína diferente en los controles utilizando espectrometría de masa. Ranganathan et al^{123,124} encuentran 3 proteínas diferentes, 2 disminuidas y una elevada. Una de las proteínas disminuidas es cistatina C y la otra es transtiretina (TTR); la proteína aumentada es un fragmento de la proteína neuroendocrina 7B2. La transtiretina también se ha encontrado en la enfermedad de Alzheimer^{125,126}, aunque la disminución es mayor en la ELA, y relacionada con los estadios finales. En pacientes fallecidos, con LCR obtenidos en la necropsia, también aparecen aumentadas las cadenas alfa y beta de la hemoglobina, probablemente debido a la rotura de la barrera hematoencefálica. En el tercer estudio, Pasinetti et al¹²⁷ encuentran 3 proteínas

Tabla 3 Efecto de sustancias en la toxicidad del líquido cefalorraquídeo (LCR) en la esclerosis lateral amiotrófica.

Autor/año	Cultivo	Potencial efecto protector	Sin efecto
Courantier et al ¹⁷ , 1993	Neuronas de rata en cultivo	Antagonista de los receptores AMPA/kainato	Antagonista de los receptores de NMDA
Terro et al ²⁰ , 1996	Células corticales de rata	Vitamina E. Alopurinol	—
Smith et al ²³ , 1998	Células VSC-4.1, que son colinérgicas	Alopurinol. Vitamina E. Glutación	—
Manabe et al ²² , 1999	Células espinales lumbares de rata	MK801, un antagonista NMDA	CNQX, un antagonista AMPA/kainato
Shahani et al ²⁴ , 2001	Neuronas motrices espinales de ratas neonatales	Ciclofosfamida	—
Tikka et al ²⁵ , 2002	Células de médula espinal de rata embrionaria	Minociclina. MK-801, antagonista NMDA. CNQX, antagonista AMPA/kainato	—
Anneser et al ²⁷ , 2004	Células gliales procedentes de embrión de ave	AIDA, un antagonista mGluR	DCG-4, agonista mGluR
Shahani et al ²⁶ , 2004	Administración en el LCR de ratas, y se analiza el tejido de la médula espinal	Deprenyl	—
Sen et al ²⁸ , 2005	Células de médula espinal de ratas embrionarias	APV, antagonista NMDA. NBAX, antagonista AMPA/kanato, mayor efecto este último	—
Anneser et al ²⁹ , 2006	Motoneuronas de médula espinal embrionarias de ave	AIDA, un antagonista mGluR. DHPG, un agonista mGluR, pero que tiene efecto dual y puede ser antagonista	Glutamato. CPPG, un antagonista mGluR. AMPA antagonista
Shobha et al ³¹ , 2007	Neuronas motrices espinales de ratas neonatales	Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa	—
Gunasekaran et al ³² , 2009	Neuronas motrices espinales de ratas neonatales	BDNF. CNTF	—

distintas de las de los controles, que identifican como cistatina C, que aparece disminuida, una de 4,8 kDa, que puede ser beta-2-microglobulina, también aumentada en la enfermedad de Alzheimer¹²⁸ y otra que es un fragmento peptídico de la proteína neurosecretora VGF; también Ranganathan et al¹²⁴ hicieron estos descubrimiento *in vivo*. Brettschneider et al¹²⁹ analizan el LCR de 14 pacientes y observan 2 proteínas sobrerreguladas y 3 infrarreguladas. Dos de estas últimas son la Zn-alfa-2-glucoproteína y la proteína precursora de la ceruloplasmina. El papel de la cistatina C en la ELA ya ha sido discutido previamente en otro artículo¹⁰⁸.

La tabla 3 incluye el resultado de las intervenciones farmacológicas sobre el cultivo y la respuesta sobre el efecto citotóxico. El efecto del factor tóxico parece estar mediado por el incremento de calcio, que se correlaciona directamente con el grado de muerte celular producido por el LCR-ELA²⁸, pero también por los canales de Nav1.6 o Kv1.6³². Tanto antagonistas de los receptores AMPA/kainato^{17,28} como de NMDA²² del glutamato, aunque con mayor intensidad los primeros, reducen parcialmente el efecto citotóxico, aunque también se ha asociado a la presencia de radicales libres²⁰ o por mediación del óxido nítrico³¹. En todo caso, la respuesta a estas intervenciones sobre el cultivo puede estar más relacionada con los mecanismos de lesión de las células que con la propia composición del LCR-ELA. Gunasekaran et al³² señalan el potencial beneficio de la aplicación de BDNF o CNTF al cultivo.

Es indudable que el LCR puede permitir identificar biomarcadores en la ELA^{130,131}, pero además su citotoxicidad es una singularidad que podría explicar aspectos evolutivos de la enfermedad. Los estudios realizados e incluidos en esta revisión adolecen de información clínica, sin que pueda correlacionarse el efecto citotóxico con situaciones clínicas de los pacientes o especialmente sobre si son formas familiares o esporádicas. Parece evidente que, para el conocimiento de este mecanismo, es necesario que nuevos estudios incluyan una mayor identificación de los pacientes de quienes se obtienen las muestras.

Conflicto de intereses

La investigación en la que se basa este artículo está financiada por el proyecto "Vulnerabilidad selectiva de la motoneurona a los efectos neurotóxicos del líquido cefalorraquídeo de pacientes en esclerosis lateral amiotrófica (ELA)" concedido por la Fundación Mútua Madrileña.

Bibliografía

1. Wolfram F, Myers L. Amyotrophic lateral sclerosis: effect of serum on anterior horn cells in tissue culture. *Science*. 1973;179:579–80.

2. Wolfgram F. Blind studies on the effect of amyotrophic lateral sclerosis sera on motor neurons in vitro. *UCLA Forum Med Sci.* 1976;19:145–9.
3. Maher I, Pouplard-Barthelaix A, Emile J. Cytotoxicity of serum from amyotrophic lateral sclerosis patients on spinal cord cells in culture. *Adv Exp Med Biol.* 1987;209:75–7.
4. Roisen FJ, Bartfeld H, Donnenfeld H, Baxter J. Neuron specific in vitro cytotoxicity of sera from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 1982;5:48–53.
5. Van der Neut R, Gispen WH, Bär PR. Serum from patients with amyotrophic lateral sclerosis induces the expression of B-50/GAP-43 and neurofilament in cultured rat fetal spinal neurons. *Mol Chem Neuropathol.* 1991;14:247–58.
6. Doherty P, Dickson JG, Flanigan TP, Kennedy PG, Welah FS. Effects of amyotrophic lateral sclerosis serum on cultured chick spinal neurons. *Neurology.* 1986;36:1330–4.
7. Horwich MS, Engel WK, Chauvin PB. Amyotrophic lateral sclerosis sera applied to cultured motor neurons. *Arch Neurol.* 1974;30:332–3.
8. Liveson J, Frey H, Bornstein MB. The effect of serum from ELA patients on organotypic nerve and muscle tissue cultures. *Acta Neuropathol.* 1975;32:127–31.
9. Lehrich JR, Couture J. Amyotrophic lateral sclerosis sera are not cytotoxic to neuroblastoma cells in tissue culture. *Ann Neurol.* 1978;4:384.
10. Touzeau G, Kato AC. Effects of amyotrophic lateral sclerosis sera on cultured cholinergic neurons. *Neurology.* 1983;33:317–22.
11. Touzeau G, Kato AC. ELA serum has no effect on three enzymatic activities in cultured human spinal cord neurons. *Neurology.* 1986;36:573–6.
12. Yu SJ, Lo ES, Cochran EJ, Lin DH, Faselis CJ, Klawans HL, et al. Cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease alters the survival of dopamine neurons in mesencephalic culture. *Exp Neurol.* 1994;126:15–24.
13. Hao R, Norgren Jr RB, Lau YS, Pfeiffer RF. Cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients inhibits the growth and function of dopaminergic neurons in culture. *Neurology.* 1995;45:138–42.
14. Hao R, Ebadi M, Pfeiffer RF. Selegiline protects dopaminergic neurons in culture from toxic factor(s) present in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 1995;200:77–80.
15. Le WD, Rowe DB, Jankovic J, Xie W, Appel SH. Effects of cerebrospinal fluid from patients with Parkinson disease on dopaminergic cells. *Arch Neurol.* 1999;56:194–200.
16. Mandybur GT, Miyagi Y, Yin W, Perkins E, Zhang JH. Cytotoxicity of ventricular cerebrospinal fluid from Parkinson patients: correlation with clinical profiles and neurochemistry. *Neurol Res.* 2003;25:104–11.
17. Couratier P, Hugon J, Sindou P, Vallat JM, Dumas M. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet.* 1993;341:265–8.
18. Nagaraja TN, Gourie-Devi M, Nalini A, Raju TR. Neurofilament phosphorylation is enhanced in cultured chick spinal cord neurons exposed to cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol.* 1994;88:349–52.
19. Rao MS, Devi MG, Nalini A, Shahani N, Raju TR. Neurofilament phosphorylation is increased in ventral horn neurons of neonatal rat spinal cord exposed to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegeneration.* 1995;4:397–401.
20. Terro F, Lesort M, Viader F, Ludolph A, Hugon J. Antioxidant drugs block in vitro the neurotoxicity of CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport.* 1996;7:1970–2.
21. Shahani N, Nalini A, Gourie-Devi M, Raju TR. Reactive astrogliosis in neonatal rat spinal cord after exposure to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 1998;149:295–8.
22. Manabe Y, Kashihara K, Shiro Y, Shohmori T, Abe K. Enhanced Fos expression in rat lumbar spinal cord cultured with cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res.* 1999;21:309–12.
23. Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1998;44:696–9.
24. Shahani N, Gourie-Devi M, Nalini A, Raju TR. Cyclophosphamide attenuates the degenerative changes induced by CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis in the neonatal rat spinal cord. *J Neurol Sci.* 2001;185:109–18.
25. Tikka TM, Vartiainen NE, Goldsteins G, Oja SS, Andersen PM, Marklund SL, et al. Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neuron disease. *Brain.* 2002;125:722–31.
26. Shahani N, Gourie-Devi M, Nalini A, Rammohan P, Shobha K, Harsha HN, et al. (–)-Deprenyl alleviates the degenerative changes induced in the neonatal rat spinal cord by CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2004;5:172–9.
27. Anneser JM, Chahli C, Ince PG, Borasio GD, Shaw PJ. Glial proliferation and metabotropic glutamate receptor expression in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63:831–40.
28. Sen I, Nalini A, Joshi NB, Joshi PG. Cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients preferentially elevates intracellular calcium and toxicity in motor neurons via AMPA/kainate receptor. *J Neurol Sci.* 2005;235:45–54.
29. Anneser JM, Chahli C, Borasio GD. Protective effect of metabotropic glutamate receptor inhibition on amyotrophic lateral sclerosis-cerebrospinal fluid toxicity in vitro. *Neuroscience.* 2006;141:1879–86.
30. Ramamohan PY, Gourie-Devi M, Nalini A, Shobha K, Ramamohan Y, Joshi P, et al. Cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients causes fragmentation of the Golgi apparatus in the neonatal rat spinal cord. *Amyotroph Lateral Scler.* 2007;8:79–82.
31. Shobha K, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Nalini A, Sathyaprabha TN, Raju TR. Altered in-vitro and in-vivo expression of glial glutamate transporter-1 following exposure to cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 2007;254:9–16.
32. Gunasekaran R, Narayani RS, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Shobha K, Nalini A, et al. Exposure to cerebrospinal fluid of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients alters Na(v)1.6 and K(v)1.6 channel expression in rat spinal motor neurons. *Brain Res.* 2009;1255:170–9.
33. Askanas V, Marangos PJ, Engel WK. CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients applied to motor neurons in culture fails to alter neuron-specific enolase. *Neurology.* 1981;31:1196–7.
34. Iwasaki Y, Ikeda K, Shiojima T, Tagaya M, Kinoshita M. Amyotrophic lateral sclerosis cerebrospinal fluid is not toxic to cultured spinal motor neurons. *Neurol Res.* 1995;17:393–5.
35. Gredal O, Witt MR, Dekermendjian K, Moller SE, Nielsen M. Cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis has no effect on intracellular free calcium in cultured cortical neurons. *Mol Chem Neuropathol.* 1996;29:141–52.
36. Johnson G, Brane D, Block W, Kammen DP, Gurklis J, Peters JL, et al. Cerebrospinal fluid protein variations in common to Alzheimer's disease and schizophrenia. *Appl Theor Electrophor.* 1992;3:47–53.
37. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *Neuro Rx.* 2004;1:213–25.
38. Choe LH, Dutt MJ, Relkin N, Lee KH. Studies of potential cerebrospinal fluid molecular markers for Alzheimer's disease. *Electrophoresis.* 2002;23:2247–51.

39. Davidsson P, Westman-Brinkmalm A, Nilsson CL, Lindbjör M, Paulson L, Andreasen N, et al. Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients. *Neuro Rep.* 2002;13:611–5.
40. Sjögren M, Davidsson P, Gottfries J, Vanderstichele H, Edman A, Vanmechelen E, et al. The cerebrospinal fluid levels of tau, growth-associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common pathophysiological process. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2001;12:257–64.
41. Sjögren M, Davidsson P, Tullberg M, Minthon L, Wallin A, Wikkelso C, et al. Both total and phosphorylated tau are increased in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;70:624–30.
42. Shaw PJ. Toxicity of CSF in motor neurone disease: a potential route to neuroprotection. *Brain.* 2002;125:693–4.
43. Matias-Guiu J, Galan L, Garcia-Ramos R, Vela A, Guerrero A. Epidemiología descriptiva en esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología.* 2007;22:368–80.
44. Matias-Guiu J, Garcia-Ramos G, Galán L, Vela A, Guerrero A. Epidemiología analítica de la esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología.* 2008;23:168–78.
45. Niebroj-Dobosz I, Janik P. Amino acids acting as transmitters in amyotrophic lateral sclerosis (ELA). *Acta Neurol Scand.* 1999;100:6–11.
46. Perry TL, Krieger C, Hansen S, Eisen A. Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Neurol.* 1990;28:12–7.
47. Camu W, Billiard M, Baldy-Moulinier M. Fasting plasma and CSF amino acid levels in amyotrophic lateral sclerosis: a subtype analysis. *Acta Neurol Scand.* 1993;88:51–5.
48. Ilzecka J, Kocki T, Stelmasiak Z, Turski WA. Endogenous protectant kynurenic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2003;107:412–8.
49. Niebrój-Dobosz I, Domitrz I, Mickielewicz A. Cytotoxic activity of serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis (ELA) patients against acetylcholinesterase. *Folia Neuropathol.* 1999;37:107–12.
50. Matsuishi T, Nagamitsu S, Shoji H, Itoh M, Takashima S, Iwaki T, et al. Increased cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm.* 1999;106:943–8.
51. Hartikainen P, Reinikainen KJ, Soinen H, Sirviö J, Soikkeli R, Riekkinen PJ. Neurochemical markers in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis and normal controls. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1992;4:53–68.
52. Werdelin L, Gjerris A, Boysen G, Fahrenkrug J, Jørgensen OS, Rehfeld JF. Neuropeptides and neural cell adhesion molecule (NCAM) in CSF from patients with ELA. *Acta Neurol Scand.* 1989;79:177–81.
53. Yoshida Y, Une F, Utatsu Y, Nomoto M, Furukawa Y, Maruyama Y, et al. Adenosine and neopterin levels in cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders. *Intern Med.* 1999;38:133–9.
54. Ilzecka J. Prostaglandin E2 is increased in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neurol Scand.* 2003;108:125–9.
55. Almer G, Teismann P, Stevic Z, Halaschek-Wiener J, Deecke L, Kostic V, et al. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ELA patients. *Neurology.* 2002;58:1277–9.
56. Malin JP, Ködding R, Fuhrmann H, Von zur Mühlen A. T4, T3 and rT3 levels in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 1989;236:57–9.
57. Klimek A, Cieślak D, Szulc-Kuberska J, Stepień H. Reduced lumbar cerebrospinal fluid corticotropin releasing factor (CRF) levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1986;74:72–4.
58. Süßmuth SD, Tumani H, Ecker D, Ludolph AC. Amyotrophic lateral sclerosis: disease stage related changes of tau protein and S100 beta in cerebrospinal fluid and creatine kinase in serum. *Neurosci Lett.* 2003;353:57–60.
59. Otto M, Bahn E, Wiltfang J, Boekhoff I, Beuche W. Decrease of S100 beta protein in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 1998;240:171–3.
60. Ilzecka J. Decreased cerebrospinal fluid cGMP levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm.* 2004;111:167–72.
61. Ikeda M, Sato I, Yuasa T, Miyatake T, Murota S. Nitrite, nitrate and cGMP in the cerebrospinal fluid in degenerative neurologic diseases. *J Neural Transm Gen Sect.* 1995;100:263–7.
62. Murata T, Ohtsuka C, Terayama Y. Increased mitochondrial oxidative damage and oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Res.* 2008;42:221–5.
63. Murata T, Ohtsuka C, Terayama Y. Increased mitochondrial oxidative damage in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2008;267:66–9.
64. Sohmiya M, Tanaka M, Suzuki Y, Tanino Y, Okamoto K, Yamamoto Y. An increase of oxidized coenzyme Q-10 occurs in the plasma of sporadic ELA patients. *J Neurol Sci.* 2005;228:49–53.
65. Molina JA, De Bustos F, Jiménez-Jiménez FJ, Gómez-Escalonilla C, García-Redondo A, Esteban J, et al. Serum levels of coenzyme Q10 in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm.* 2000;107:1021–6.
66. Taskiran D, Sagduyu A, Yüceyar N, Kutay FZ, Pöğün S. Increased cerebrospinal fluid and serum nitrite and nitrate levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Neurosci.* 2000;101:65–72.
67. Siciliano G, Piazza S, Carlesi C, Del Corona A, Franzini M, Pompella A, et al. Antioxidant capacity and protein oxidation in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 2007;254:575–80.
68. Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Rios C. Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem Res.* 2008;33:17–23.
69. Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C. Increase in oxidized NO products and reduction in oxidized glutathione in cerebrospinal fluid from patients with sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 1999;260:204–6.
70. De Bustos F, Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Esteban J, Guerrero-Sola A, Zurdo M, et al. Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm.* 1998;105:703–8.
71. Ryberg H, Söderling AS, Davidsson P, Blennow K, Caidahl K, Persson LI. Cerebrospinal fluid levels of free 3-nitrotyrosine are not elevated in the majority of patients with amyotrophic lateral sclerosis or Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2004;45:57–62.
72. Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Murillo-Bonilla L, Rios C. Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ELA patients. *Neurochem Res.* 2003;28:699–703.
73. Widl K, Brettschneider J, Schattauer D, Süßmuth S, Huber R, Ludolph AC, et al. Erythropoietin in cerebrospinal fluid: age-related reference values and relevance in neurological disease. *Neurochem Res.* 2007;32:1163–8.
74. Brettschneider J, Widl K, Ehrenreich H, Riepe M, Tumani H. Erythropoietin in the cerebrospinal fluid in neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett.* 2006;404:347–51.
75. Brettschneider J, Widl K, Schattauer D, Ludolph AC, Tumani H. Cerebrospinal fluid erythropoietin (EPO) in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 2007;416:257–60.

76. Montine TJ, Beal MF, Cudkowicz ME, O'Donnell H, Margolin RA, McFarland L, et al. Increased CSF F2-isoprostane concentration in probable AD. *Neurology*. 1999;52:562–5.
77. Ihara Y, Nobukuni K, Takata H, Hayabara T. Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu, Zn-superoxide dismutase mutation. *Neurol Res*. 2005;27:105–8.
78. Jacobsson J, Rosengren L, Blennow K, Andersen PM. Cerebrospinal fluid neurofilament light levels in amyotrophic lateral sclerosis: impact of SOD1 genotype. *Eur J Neurol*. 2007;14:1329–33.
79. Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, Persson LI, Wikkelso C. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem*. 1996;67:2013–8.
80. Jiménez-Jiménez FJ, Hernánz A, Medina-Acebrón S, De Bustos F, Zurdo JM, Alonso H, et al. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2005;111:114–7.
81. Sjögren M, Davidsson P, Wallin A, Granérus AK, Grundström E, Askmark H, et al. Decreased CSF-beta-amyloid 42 in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis may reflect mistreatment of beta-amyloid induced by disparate mechanisms. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2002;13:112–8.
82. Brettschneider J, Petzold A, Süsmuth SD, Ludolph AC, Tumani H. Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ELA. *Neurology*. 2006;66:852–6.
83. Steinacker P, Hendrich C, Sperfeld AD, Jesse S, Von Arnim CA, Lehnert S, et al. TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*. 2008;65:1481–7.
84. Kasai T, Tokuda T, Ishigami N, Sasayama H, Foulds P, Mitchell DJ, et al. Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2009;117:55–62.
85. Itzecka J, Stelmasiak Z, Dobosz B. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Neurochir Pol*. 2001;35:1035–43.
86. Lorenzl S, Albers DS, LeWitt PA, Chirichigno JW, Hilgenberg SL, Cudkowicz ME, et al. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases are elevated in cerebrospinal fluid of neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*. 2003;207:71–6.
87. Itzecka J. Decreased cerebrospinal fluid cytochrome c levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67:264–9.
88. Rentzos M, Nikolaou C, Rombos A, Boufidou F, Zoga M, Dimitrakopoulos A, et al. RANTES levels are elevated in serum and cerebrospinal fluid in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2007;8:283–7.
89. Itzecka J. Cerebrospinal fluid Flt3 ligand level in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2006;114:205–9.
90. Tsuboi Y, Yamada T. Increased concentration of C4d complement protein in CSF in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57:859–61.
91. Niebroj-Dobosz I, Dziewulska D, Janik P. Auto-antibodies against proteins of spinal cord cells in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ELA). *Folia Neuropathol*. 2006;44:191–6.
92. Greiner A, Schmausser B, Petzold K, Krüger H, Marx A. Neuronal targets of serum and cerebrospinal fluid autoantibodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 1996;91:67–71.
93. Niebroj-Dobosz I, Jamrozik Z, Janik P, Hausmanowa-Petrušewicz I, Kwieciński H. Anti-neural antibodies in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis (ELA) patients. *Acta Neurol Scand*. 1999;100:238–43.
94. Sekizawa T, Openshaw H, Ohbo K, Sugamura K, Itoyama Y, Niland JC. Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases. *J Neurol Sci*. 1998;154:194–9.
95. Krieger C, Perry TL, Ziltener HJ. Amyotrophic lateral sclerosis: interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid. *Can J Neurol Sci*. 1992;19:357–9.
96. Moreau C, Devos D, Brunaud-Danel V, Defebvre L, Perez T, Destée A, et al. Elevated IL-6 and TNF-alpha levels in patients with ELA: inflammation or hypoxia? *Neurology*. 2005;65:1958–60.
97. Grundström E, Lindholm D, Johansson A, Blennow K, Askmark H. GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*. 2000;11:1781–3.
98. Wilms H, Sievers J, Dengler R, Bufler J, Deuschl G, Lucius R. Intrathecal synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in amyotrophic lateral sclerosis: further evidence for microglial activation in neurodegeneration. *J Neuroimmunol*. 2003;144:139–42.
99. Nagata T, Nagano I, Shiote M, Narai H, Murakami T, Hayashi T, et al. Elevation of MCP-1 and MCP-1/VEGF ratio in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Res*. 2007;29:772–6.
100. Tanaka M, Kikuchi H, Ishizu T, Minohara M, Osoegawa M, Motomura K, et al. Intrathecal upregulation of granulocyte colony stimulating factor and its neuroprotective actions on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65:816–25.
101. Itzecka J. Cerebrospinal fluid vascular endothelial growth factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2004;106:289–93.
102. Moreau C, Devos D, Brunaud-Danel V, Defebvre L, Perez T, Destée A, et al. Paradoxical response of VEGF expression to hypoxia in CSF of patients with ELA. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77:255–7.
103. Devos D, Moreau C, Lassalle P, Perez T, De Seze J, Brunaud-Danel V, et al. Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ELA patients. *Neurology*. 2004;62:2127–9.
104. Cieślak D, Szulc-Kuberska J, Stepień H, Klimek A. Epidermal growth factor in human cerebrospinal fluid: reduced levels in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 1986;233:376–7.
105. Itzecka J, Stelmasiak Z, Dobosz B. Transforming growth factor-beta 1 (tgf-beta 1) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine*. 2002;20:239–43.
106. Bilic E, Bilic E, Rudan I, Kusec V, Zurak N, Delimar D, et al. Comparison of the growth hormone, IGF-1 and insulin in cerebrospinal fluid and serum between patients with motor neuron disease and healthy controls. *Eur J Neurol*. 2006;13:1340–5.
107. Pirttilä T, Vanhatalo S, Turpeinen U, Riikonen R. Cerebrospinal fluid insulin-like growth factor-1, insulin growth factor binding protein-2 or nitric oxide are not increased in MS or ELA. *Acta Neurol Scand*. 2004;109:337–41.
108. Matías-Guiu J, García-Ramos R, Galán L, Barcia J. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurología*. 2008;23:518–29.
109. Gordon PH, Moore DH, Miller RG, Florence JM, Verheijde JL, Doorish C, et al. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol*. 2007;6:1045–53.
110. Matías-Guiu J, Galán L, García-Ramos R, Barcia JA. Superoxide dismutase: The cause of all amyotrophic lateral sclerosis? *Ann Neurol*. 2008;64:356–7.
111. Gamez J. Minocycline for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: neuroprotector or neurotoxin? Reflections on another failure of translational medicine. *Neurología*. 2008;23:484–93.

112. Galán L, Vela A, Guerrero A, Barcia JA, García-Verdugo JM, Matías-Guiu J. Modelos experimentales en esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología*. 2007;22:381–8.
113. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, et al. Wild-type non neuronal cells extended survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*. 2003;302:113–7.
114. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1990;28:18–25.
115. Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 1992;326:1464–8.
116. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1995;38:73–84.
117. Pardo AC, Wong V, Benson LM, Dykes M, Tanaka K, Rothstein JD, et al. Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD(G39A) mice. *Exp Neurol*. 2006;201:120–30.
118. Matías-Guiu J, Barcia JA, García-Verdugo JM, Galán L, Vela A, García-Ramos R. Terapia celular en la esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología*. 2008;23:226–37.
119. Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*. 2006;312:1389–92.
120. Ekegren T, Hanrieder J, Bergquist J. Clinical perspectives of high-resolution mass spectrometry-based proteomics in neuroscience-Exemplified in amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery research. *J Mass Spectrom*. 2008;43:559–71.
121. Maurer MH. Proteomics of brain extracellular fluid (ECF) and cerebrospinal fluid (CSF). *Mass Spectrom Rev*. 2010;29:17–28.
122. Ramström M, Ivonin I, Johansson A, Askmark H, Markides KE, Zubarev R, et al. Cerebrospinal fluid protein patterns in neurodegenerative disease revealed by liquid chromatography-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Proteomics*. 2004;4:4010–8.
123. Ranganathan S, Williams E, Ganchev P, Gopalakrishnan V, Lacomis D, Urbinelli L, et al. Proteomic profiling of cerebrospinal fluid identifies biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 2005;95:1461–71.
124. Ranganathan S, Nicholl GC, Henry S, Lutka F, Sathanoori R, Lacomis D, et al. Comparative proteomic profiling of cerebrospinal fluid between living and post mortem ALS and control subjects. *Amyotroph Lateral Scler*. 2007;8:373–9.
125. Serot JM, Christmann D, Dubost T, Couturier M. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1997;63:506–8.
126. Biroccio A, Del Boccio P, Panella M, Bernardini S, Dillio C, Gambi D, et al. Differential post-translational modifications of transthyretin in Alzheimer's disease: a study of the cerebral spinal fluid. *Proteomics*. 2006;6:2005–13.
127. Pasinetti GM, Ungar LH, Lange DJ, Yemul S, Deng H, Yuan X, et al. Identification of potential CSF biomarkers in ELA. *Neurology*. 2006;66:1218–22.
128. Carrette O, Desmalte I, Scherl A, Yalkinoglu O, Corthals G, Burkhard P, et al. A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for diagnosis of Alzheimer disease. *Proteomics*. 2003;3:1486–94.
129. Brettschneider J, Mogel H, Lehmsiek V, Ahlert T, Süßmuth S, Ludolph AC, et al. Proteome analysis of cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis (ELA). *Neurochem Res*. 2008;33:2358–63.
130. Mitchell RM, Freeman WM, Randazzo WT, Stephens HE, Beard JL, Simmons Z, et al. A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2009;72:14–9.
131. Wagner KR. The need for biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis drug development. *Neurology*. 2009;72:11–2.