

# GENÉTICA Y ELA

Implicaciones y retos en el conocimiento,  
diagnóstico y manejo de la enfermedad

# GENETICS & ALS

Implications and challenges in knowledge,  
diagnosis and disease management



# **GENÉTICA Y ELA**

Implicaciones y retos en el conocimiento,  
diagnóstico y manejo de la enfermedad

# **GENETICS & ALS**

Implications and challenges in knowledge,  
diagnosis and disease management

El contenido expuesto en este libro es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Reservados todos los derechos.

Ni la totalidad ni parte de este libro puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética, o cualquier almacenamiento de información y sistema de recuperación, sin permiso escrito de la Editorial Centro de Estudios Ramón Areces.

EDICIÓN 2018

© Fundación Luzón  
Caracas 7 bis, bajo  
28004 Madrid,  
España  
T 34 91 447 56 77  
[info@ffluzon.org](mailto:info@ffluzon.org)  
[www.ffluzon.org](http://www.ffluzon.org)

© Editorial Centro de Estudios Ramón Areces S.A.  
Tomás Bretón, 21 - 28045 Madrid  
T 915 398 659  
F 914 681 952  
[cerala@cerala.es](mailto:cerala@cerala.es)  
[www.cerala.es](http://www.cerala.es)

© Fundación Ramón Areces  
Vitruvio, 5 - 28006 Madrid  
[www.fundacionareces.es](http://www.fundacionareces.es)

© Autores

Diseño:  
KEN | [www.ken.es](http://www.ken.es)

Depósito legal: M-7284-2019

Impreso por:  
ANEBRI, S.A.  
Antonio González Porras, 35-37  
28019 Madrid  
Impreso en España | Printed in Spain

# **GENÉTICA Y ELA**

Implicaciones y retos en el conocimiento,  
diagnóstico y manejo de la enfermedad

# **GENETICS & ALS**

Implications and challenges in knowledge,  
diagnosis and disease management



FUNDACIÓN  
**LUZÓN**  
UNIDOS CONTRA LA ELA

FUNDACIÓN  
RAMÓN ARECES

# INDEX

INTRODUCTION	8
ACKNOWLEDGEMENTS	10
EXECUTIVE SUMMARY	12
1. GENES AND ETIOPATHOGENESIS	16
1.1. Genetics and ALS during the second decade of the 21st century. Nearly 150 years of history. Dr. Alberto García Redondo .....	16
1.2. Transitioning Next-Generation Sequencing Discoveries in ALS Genetics to Therapeutic Treatments. Prof. John Landers.....	18
1.3. Genetic counselling complexity in multifaceted diseases: ALS as a case. Dr. Adolfo López de Munain.....	24
1.4. How will genetic discoveries influence the management of ALS in the future? Dr. Alberto García Redondo.....	26
2. ANIMAL AND CELLULAR MODELS IN ALS	34
2.1. New perspectives in cellular and animal models of ALS. Dr. Ana Cristina Calvo .....	34
2.2. Variability in ALS disease progression: Insights from mutant SOD1 mouse models. Dr. Caterina Bendotti.....	36
2.3. NLRP3 as a molecular marker in an animal model of ALS. Dr. Rosario Osta.....	40
2.4. New animal models for ALS disease and new insights about Induced Pluripotent Stem Cells in ALS. Dr. Ana Cristina Calvo.....	42
3. ENVIRONMENTAL FACTORS AND EPIGENETICS	56
3.1. Main environmental factors associated with ALS and their molecular impact on the motoneuron epigenome. Dr. María Antonia Barceló and Dr. Pedro Vizán .....	56
3.2. How can we use epigenetics to understand ALS? Dr. Ammar Al-Chalabi .....	60
3.3. Environmental factors that modulates ALS risk. Dr. Valentina Gallo.....	66
3.4. The challenge of associating environmental effects associated with the appearance of ALS at an epigenetic level. Dr. María Antonia Barceló and Dr. Pedro Vizán .....	68
4. PROSPECTS IN THERAPY	76
4.1. Overview of gene therapy and its potential application in ALS. Dr. Ernest Milián .....	76
4.2. Translating Neurodegeneration: Models, Mechanisms and Gene-Based Therapeutics. Prof. Mimoun Azzou .....	78
4.3. The viability of gene therapy for ALS treatment. Challenges and difficulties. Dr. Ernest Milián .....	82
SCIENTIFIC COMMITTEE	94
ABOUT LUZÓN FOUNDATION	112

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
AGRADECIMIENTOS	11
RESUMEN EJECUTIVO	13
<b>1. GENES Y ETIOPATOGENIA</b>	<b>17</b>
1.1. Genética y ELA durante la segunda década del siglo 21. Casi 150 años de historia. Dr. Alberto García Redondo .....	17
1.2. Cómo transformaremos los resultados en el hallazgo de nuevos genes a tratamientos terapéuticos en la ELA. Prof. John Landers .....	19
1.3. El consejo genético en las enfermedades poliédricas: el caso de la ELA. Dr. Adolfo López de Munain.....	25
1.4. ¿Cómo van a influir los hallazgos genéticos en el manejo de la ELA en el futuro? Dr. Alberto García Redondo .....	27
<b>2. MODELOS ANIMALES Y CELULARES EN LA ELA</b>	<b>35</b>
2.1. Nuevas perspectivas en modelos celulares y animales de ELA. Dra. Ana Cristina Calvo.....	35
2.2. Variabilidad de la progresión de la ELA: perspectivas derivadas de modelos de ratón SOD1. Dr. Caterina Bendotti .....	37
2.3. NLRP3 como marcador molecular en modelos animales de ELA. Dra. Rosario Osta .....	41
2.4. Nuevos modelos animales de ELA y nuevas perspectivas en células madre pluripotentes inducidas. Dra. Ana Cristina Calvo .....	43
<b>3. FACTORES AMBIENTALES Y EPIGENÉTICA</b>	<b>57</b>
3.1. Principales factores ambientales asociados con la ELA y su impacto molecular en el epigenoma de las motoneuronas. Dra. María Antonia Barceló y Dr. Pedro Vizán .....	57
3.2. ¿Cómo podemos emplear la epigenética para entender la ELA? Dr. Ammar Al-Chalabi .....	61
3.3. Factores ambientales que modulan el riesgo de ELA. Dra. Valentina Gallo .....	67
3.4. El reto de la asociación de efectos ambientales a la aparición de la ELA a nivel epidemiológico. Dra. María Antonia Barceló y Dr. Pedro Vizán .....	69
<b>4. PERSPECTIVAS EN TERAPIA</b>	<b>77</b>
4.1. Perspectiva general sobre la terapia génica y su potencial aplicación en ELA. Dr. Ernest Milián.....	77
4.2. Descifrando la neurodegeneración: Modelado, mecanismos y terapias basadas en genes. Prof. Mimoun Azzouz .....	79
4.3. La viabilidad de la terapia génica para el tratamiento de la ELA. Retos y dificultades. Dr. Ernest Milián .....	83
<b>COMITÉ CIENTÍFICO</b>	<b>95</b>
<b>SOBRE LA FUNDACIÓN LUZÓN</b>	<b>113</b>

## INTRODUCTION

As with other major neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or Parkinson's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a disease that can be hereditary. It is known that 5 to 10% of patients with ALS have or have had first or second-degree family members with the same disease or frontotemporal dementia. We call these cases "familial ALS". For the rest of patients, the cause of the disease is unknown. These are cases with "sporadic ALS".

Thanks to technical advances that occurred primarily in the 1990s, we now know of more than 40 genes that are directly related to ALS. We have also been able to translate this knowledge to all patients. Little by little, we are learning why the process of cell death in motor neurons occurs in this pathology and we are beginning to understand the pathways that may lead to effective personalized treatments (personalized medicine).

Genetics allows us to continually go deeper into the disease's onset and progression. In this sense, we can advance into fields that are intimately related:

1. Find biomarkers that allow us to make an early diagnosis that is more certain or create patient stratification models that are more precise for developing pharmacological treatments.
2. Generate experimental models (both transgenic animal and cellular models) that allow us to more efficiently develop therapies.
3. Understand whether or not genetic causes are related with disease onset in cases of sporadic ALS, not only in hereditary cases, and how the environment can directly influence genes to initiate neurodegenerative processes.
4. And finally, try to directly or indirectly modify the genetic alterations related to ALS in order to create a definitive therapy that will block progression of the disease - Gene Therapy.

One of the primary objectives of the Francisco Luzon Foundation is to promote translational research in ALS. In order to achieve this, we consider it key to attract scientific talent and facilitate collaboration between groups in different countries and professionals from different disciplines.

With the *Luzon Foundation Monographic Meetings*, we seek to contribute to collaboration between Spanish groups and other countries in the field of ALS, promoting both scientific exchange and development of new joint projects. In addition, the program seeks to generate a document that will become the point of reference for the state of the art, the latest advances and the challenges for the future in ALS R&D.

The 2018 edition of the *Monographic Meetings* has focused on the genetic implications and the challenges in knowledge, diagnosis and management of the disease.

# INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica, como otras enfermedades neurodegenerativas, puede ser hereditaria. Se sabe que entre el 5 y el 10% de los pacientes de ELA tienen o han tenido familiares de primer o segundo grado con la misma enfermedad o con Demencia Frontotemporal. Hablamos, en estos casos, de “ELA Familiar”. En el resto de los pacientes, la causa de la enfermedad sigue siendo desconocida. Son los casos de “ELA Esporádica”.

Gracias a los avances producidos, fundamentalmente desde los años 90, con la descripción del primer gen relacionado con la enfermedad, hoy en día conocemos más de 40 genes directamente relacionados con la ELA.

Estamos aprendiendo, poco a poco, por qué se produce el proceso de muerte celular de las neuronas motoras en esta patología y comenzamos a comprender los caminos que pueden llevarnos a conseguir tratamientos eficaces y personalizados (medicina personalizada).

La genética nos permite profundizar continuamente en los mecanismos implicados en la aparición de la enfermedad o los relacionados con su evolución. En este sentido, podemos avanzar en campos íntimamente relacionados:

1. Encontrar biomarcadores que nos permitan realizar un diagnóstico temprano y más certero, o generar modelos de estratificación de pacientes más precisos para el desarrollo de tratamientos farmacológicos.
2. Generar modelos experimentales (tanto animales transgénicos como modelos celulares) que nos permitan avanzar en el desarrollo de terapias de forma más eficiente.
3. Comprender si las causas genéticas pueden estar relacionadas con la aparición de la enfermedad en los casos de ELA Esporádica, y no sólo en los casos hereditarios, y cómo el medio ambiente puede influir de forma directa sobre los genes para iniciar el proceso neurodegenerativo.
4. Intentar modificar de forma directa o indirecta las alteraciones genéticas relacionadas con la ELA a fin de generar una terapia definitiva que permita evitar el progreso de la enfermedad—Terapia génica.

Uno de los objetivos centrales de la Fundación Francisco Luzón es el impulso y fomento de la investigación traslacional en Esclerosis Lateral Amiotrófica. Para conseguirlo, consideramos clave atraer el talento científico y facilitar la colaboración puntera entre grupos de distintos países y profesionales de diferentes disciplinas.

Con la iniciativa *Encuentros Monográficos Fundación Luzón*, pretendemos contribuir a fomentar la colaboración puntera entre grupos españoles y de otros países en el ámbito de la ELA, favoreciendo tanto el intercambio científico como el desarrollo de nuevos proyectos conjuntos. Adicionalmente, el programa pretende generar un documento que se convierta en referente sobre el estado de la cuestión, los últimos avances y los retos a futuro en la I+D+i de la ELA.

La edición 2018 del programa de *Encuentros Monográficos* se ha centrado en las implicaciones y retos que presenta la Genética relacionados con el conocimiento, diagnóstico y manejo de la enfermedad.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Fundación Luzón Would like to thank all those who have helped to make possible our first *Monographic Meeting* and the edition of this document.

We would like to offer our special thanks to Dr. Povedano, scientific coordinator of this edition, and all the coordinators of each part: Dr. Alberto García Redondo, Dr. Ana Cristina Calvo Royo, Dr. María Antonia Barceló, Dr. Pedro Vizán and Dr. Ernest Milián. Without their help and dedication this project would not be possible.

We would like to express also our very great appreciation to the national and international speakers that have contribute to the International Symposium *Genetics and ALS: Implications and challenges in knowledge, diagnosis and disease management* and to the authors of this document.

Finally, we would like to express our deep gratitude to Fundación Ramón Areces and their marvelous team, for their generosity and support which enabled us to develop this project.

To all of them, thank you so much!

## AGRADECIMIENTOS

La Fundación Luzón quiere dar las gracias a todas aquellas personas que han hecho posible nuestro primer *Encuentro Monográfico* y la edición de este documento.

Queremos mostrar nuestro especial agradecimiento a la Dra. Povedano, coordinadora científica de esta edición, y a todos los coordinadores de cada bloque temático: Dr. Alberto García Redondo, Dra. Ana Cristina Calvo Royo, Dra. María Antonia Barceló, Dr. Pedro Vizán y Dr. Ernest Milián. Sin su ayuda y dedicación este proyecto no hubiera sido posible.

Queremos expresar también nuestro más sincero agradecimiento a los ponentes españoles e internacionales que contribuyeron al desarrollo del simposio internacional *Genética y ELA: Implicaciones y retos en el conocimiento, diagnóstico y manejo de la enfermedad* y a los autores del presente documento.

Por último, queremos expresar nuestro más profundo agradecimiento a la Fundación Ramón Areces y a su maravilloso equipo, por su generosidad y soporte que ha hecho posible el desarrollo de este proyecto.

A todos ellos, imuchas gracias!

## EXECUTIVE SUMMARY

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rapidly progressive neurodegenerative disease characterized by a gradual loss of upper and lower motor neurons leading to muscular atrophy and paralysis of the spinal musculature and bulbar. The patient normally dies from respiratory failure.

Brain and Walton in 1969 coined the term motor neuron disease (MND) as an entity characterized by progressive muscle weakness and atrophy that leads to the death of the patient within a few years.

It is clear that this term encompasses a heterogeneous group of diseases affecting the first and/or second motor neuron, of a sporadic or hereditary nature, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS), which accounts for 85% of motor neuron diseases.

About 10-15% of ALS patients have a familial form of the disease, with at least two first- or second-degree relatives with ALS. If no family history is identified, the diagnosis is sporadic ALS. The incidence of sporadic ALS shows little variation in Western countries, ranging from 1 to 2 per 100,000 person-years (although heterogeneous in some other areas), with an estimated lifetime risk of 1 in 400. ALS is rare before age 40 and increases exponentially with age. The median age of onset is 58-63 years for sporadic ALS and 40-60 years for familial ALS. Men are at greater risk than women, with a male to female ratio of 1.2-1.5.

Different phenotypes and presentations have been identified, defined according to where the symptoms of the disease first appear (spinal, bulbar, flail leg, flail arm, pyramidal or respiratory); according to whether the most affected motor neuron is the upper or lower (primary lateral sclerosis, progressive muscle atrophy and classic ALS) and according to how rapidly the disease progresses (fast or slow). The main importance of these different phenotypes lies in their prognostic value, because some are less disabling and spread more slowly than others.

It should be noted that this clinical spectrum of motor syndromes may have associated extramotor symptoms, such as sensory, extrapyramidal or cognitive symptoms.

The spinal phenotype represents 42% of total ALS cases; the bulbar phenotype 33.5% of total cases; followed by the flail leg phenotype (8.5%), the flail arm phenotype (6.5%), the pyramidal (5%) and the respiratory (4.5%).

Recently there have been discussions about whether the different phenotypes correspond to diseases with different etiology or are related to environmental exposures or genetic factors.

Most ALS patients do not have a family history of this condition and for this reason it is considered a mainly "sporadic" disease. Familial ALS is estimated to account for up to 10% of the incidence of the disease, and related mutations so far have been able to explain up to 70-80% of these cases, according to the population studied, through mutations in more than 20 genes, mostly with an autosomal dominant inheritance pattern. It is important to consider that mutations in these genes have been found in a substantial minority of patients with no family history, indicating that they may also act

## RESUMEN EJECUTIVO

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa, rápidamente progresiva, caracterizada por una pérdida gradual de las neuronas motoras superiores e inferiores que conduce a la atrofia muscular y parálisis de la musculatura espinal y bulbar. El paciente fallece normalmente por un fallo respiratorio.

Brain y Walton en 1969 acuñaron el término de enfermedad de neurona motora (MND por sus siglas en terminología anglosajona: Motor Neuron Disease) como una entidad caracterizada por la debilidad y atrofia muscular de carácter progresivo que lleva a la muerte del paciente en unos años.

Está claro que este término engloba a un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan a la primera y/o segunda neurona motora, de carácter esporádico o hereditario, y entre ellas está la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que representa el 85% de las enfermedades de neurona motora.

Alrededor del 10-15% de los pacientes con ELA tienen una forma familiar de la enfermedad, con al menos dos parientes de primer o segundo grado con ELA. Si no se identifican antecedentes familiares, el diagnóstico es de ELA esporádica. La incidencia de ELA esporádica muestra poca variación en los países occidentales, oscilando entre 1 y 2 por 100.000 años-persona (aunque presenta heterogeneidad en algunas otras zonas), con un riesgo estimado de por vida de 1 en 400. La ELA es rara antes de los 40 años y aumenta exponencialmente con la edad. La edad media de inicio es de 58-63 años para la ELA esporádica y de 40-60 años para la ELA familiar. Los hombres tienen un mayor riesgo que las mujeres, con una proporción entre hombres y mujeres de 1,2-1,5.

Se han identificado diferentes fenotipos y presentaciones, definiéndose en función de dónde aparecen en primer lugar los síntomas de la enfermedad (espinal, bulbar, *flail leg*, *flail arm*, piramidal o respiratoria); en función de si la motoneurona más afectada es la superior o la inferior (esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva y ELA clásica) y en función de cuán rápidamente progresiona la enfermedad (rápida o lenta). La principal importancia de estos diferentes fenotipos está en su valor pronóstico, debido a que algunos son menos incapacitantes y se extienden más lentamente que otros.

Se debe tener en cuenta que este espectro clínico de síndromes motores pueden tener asociados síntomas extramotores, tales como síntomas sensitivos, extrapiramidales o cognitivos.

El fenotipo espinal representa el 42% del total de casos de ELA; el fenotipo bulbar, el 33,5% del total de casos; seguidos del fenotipo *flail leg* (8,5%), el fenotipo *flail arm* (6,5%), el piramidal (5%) y el respiratorio (4,5%).

Recientemente han surgido discusiones sobre si los diferentes fenotipos corresponden a enfermedades con diferente etiología o bien están relacionados con exposiciones ambientales o factores genéticos.

La mayor parte de los pacientes de ELA no tienen un historial familiar de esta condición y por este motivo se considera una enfermedad principalmente "esporádica". La ELA familiar se estima que corresponde hasta a un 10% de la incidencia de la enfermedad, y las mutaciones relacionadas hasta el momento han podido explicar hasta un 70-80% de estos casos, según la población estudiada, a través de mutaciones en más de 20 genes, mayoritariamente con un patrón de herencia autosómico dominante. Es importante considerar que mutaciones en estos genes han sido encontradas en una minoría sustancial de los pacientes sin historia familiar, indicando que estas pueden

as low-penetrating variants with a determinantly significant effect on the generation of the disease.

The discovery of genes involved in the disease has allowed the discovery of new etiopathogenic mechanisms that will allow biomarkers to be obtained and, at the same time, therapeutic targets.

We know that the heterogeneity in the incidence and prevalence of ALS may be a consequence of the result of different diagnostic criteria, different clinical practice and different ways of collecting cases. However, an important part of this heterogeneity can be attributed to the interrelationship between genetic and non-genetic factors. These non-genetic factors may include lifestyle-related variables (smoking, antioxidant consumption, physical exercise and body mass index), medical conditions (head trauma, metabolic diseases, cancer and inflammatory diseases) and occupational and environment-related exposures (-methylamino-L-alanine -BMAA-, viral infections, electromagnetic fields, metals and pesticides).

In summary, ALS should be considered a clinical syndrome, with different forms of presentation and multiple causes. Although it is reasonable to expect that motor neuron degeneration can be prevented or slowed by identifying specific nodal points in the cellular pathways that are common in all cases, independently of each other, it is also reasonable to expect that motor neuron degeneration can be prevented or slowed by identifying specific nodal points in the cellular pathways that are common in all cases.

Dr. Mónica Povedano

actuar también como variantes poco penetrantes con un efecto determinantemente significativo en la generación de la enfermedad.

El descubrimiento de genes implicados con la enfermedad ha permitido descubrir nuevos mecanismos etiopatogénicos que van a permitir obtener biomarcadores y a su vez ser dianas terapéuticas.

Sabemos que la heterogeneidad en la incidencia y la prevalencia de la ELA puede ser una consecuencia del resultado de criterios de diagnóstico diferentes, diferente práctica clínica y formas diferentes de recoger los casos. Sin embargo, una parte importante de esta heterogeneidad puede ser atribuida a la interrelación entre factores genéticos y no genéticos. Estos factores no genéticos pueden incluir variables relacionadas con el estilo de vida (tabaquismo, consumo de antioxidantes, ejercicio físico e índice de masa corporal), condiciones médicas (trauma craneal, enfermedades metabólicas, cáncer y enfermedades inflamatorias) y exposiciones relacionadas con la ocupación y el medio ambiente ( $\beta$ -methylamino-L-alanina -BMAA-, infecciones virales, campos electromagnéticos, metales y pesticidas).

En resumen, la ELA debe ser considerada un síndrome clínico, con diferentes formas de presentación y con múltiples causas. Aunque es razonable esperar que la degeneración de las motoneuronas pueda ser prevenida o aminorada identificando puntos nodales específicos en las vías celulares que sean comunes en todos los casos, independientemente de la etiología, la investigación ha fallado hasta ahora en identificar dianas terapéuticas comunes. El incremento significativo del conocimiento sobre la patogénesis de la ELA en las últimas décadas ha sido posible gracias a los descubrimientos genéticos y es un argumento a favor de un modelo según el cual distintos factores biológicos pueden desencadenar la ELA y en el que el punto de convergencia es el sistema en red de la corteza motoneurona con toda su complejidad, más que sobre un tipo celular específico.

Dra. Mónica Povedano

# 1. GENES AND ETIOPATHOGENESIS

## 1.1. GENETICS AND ALS DURING THE SECOND DECADE OF THE 21ST CENTURY. NEARLY 150 YEARS OF HISTORY / DR. ALBERTO GARCÍA REDONDO

The neurologist Jean Martin Charcot described ALS for the first time in 1869 at the Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France. Around 150 years later, knowledge has been advanced exponentially, but the results of the enormous efforts made in research regarding ALS have not yet translated into slowing the progression or even the cure of this fatal disease<sup>1</sup>.

The only way we truly have to understand the causes of the onset of the disease and its progression is to understand its genetic bases. Although the majority of cases appear to occur as sporadic ALS “sALS” (without known causes, but probably between environmental and genetic factors) around 5 and 10% are considered as familial ALS “fALS”, with a family history in the first or second degree of ALS or FTD (frontotemporal dementia). Clinically, fALS and sALS are similar. However, fALS cases are distinguished by an earlier mean age of onset (46 years) than sALS cases (56 years)<sup>2</sup>. Moreover, the sex ratio in fALS cases is 1:1. Several studies have also indicated that male sex is a non-genetic risk factor for ALS, as patient populations have a 3:2 male:female ratio. This sex difference, however, does not hold true for all populations, and might depend on the age structure of the studied group, as men predominate in younger groups of patients<sup>3</sup>.

All these data lead us to believe that the molecular physiological conditions are the main reason for the development of this disease, indicating that genetics are the principal way to improve our understanding of the causes of ALS or FTD.

Driven in large part by advances in genotyping and sequencing technology the molecular bases of ALS have been developed during the last 25 years. Mutations in *SOD1* were the first identified cause of ALS<sup>4</sup> contributing to 20% of fALS and 2% of sALS. More recently, pathogenic hexanucleotide repeat expansions located within the first intron of the *C9orf72* gene on chromosome 9p21 was identified as the most common cause of both fALS (40%) and sALS (7%)<sup>5,6</sup>.

In this sense, the studies of this pathology entered in a radical new era from 2007, when the group of Virginia Lee at Penn University, discovered the very close relation between ALS and FTD demonstrating the accumulation of a common protein in the neurons affected in both disorders, hyperphosphorylated TDP-43, through the study of patients necropsies<sup>7</sup>. Ubiquitin-positive, tau- and α-synuclein-negative inclusions are hallmarks of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions and amyotrophic lateral sclerosis.

With the amazing discovery of TDP-43 pathology, both the group of Penn Univ. and Montreal Universities (Guy A Rouleau) confirmed the presence of mutations in *TARDBP* gene (coding TDP-43 protein) in both conditions<sup>8,9</sup>.

A new highly relevant gene was directly related with ALS in the search for mutations in a protein with similar molecular characteristics to TDP-43, named FUS<sup>10</sup>, placed in

# 1. GENES Y ETIOPATOGENIA

## 1.1. GENÉTICA Y ELA DURANTE LA SEGUNDA DÉCADA DEL SIGLO 21. CASI 150 AÑOS DE HISTORIA / DR. ALBERTO GARCÍA REDONDO

El neurólogo Jean Martin Charcot describió por primera vez la ELA en 1869 en el Hôpital de la Salpêtrière, París, Francia. Casi 150 años después, el conocimiento ha avanzado exponencialmente, pero los resultados de los grandes esfuerzos hechos en la investigación sobre la ELA no se han trasladado en terapias para ralentizar la progresión o curar esta enfermedad terminal<sup>1</sup>.

La única manera que tenemos de entender la causa del inicio de la enfermedad y su progresión es entender sus bases genéticas. Aunque en la mayoría de los casos la ELA se presenta como ELA esporádica, ELAe o "sALS" (por sus siglas en inglés), sin causa conocida pero probablemente con una mezcla de factores ambientales y genéticos, entre el 5 y el 10% de los casos se consideran de ELA familiar, ELAf o "fALS" (por sus siglas en inglés), con un historial familiar en el primer o segundo grado de ELA o DFT (demencia frontotemporal). Clínicamente, tanto la ELA familiar como la esporádica son similares. Sin embargo, los casos de ELA familiar se distinguen por una edad media de inicio anterior a la de los casos esporádicos (46 vs. 56 años)<sup>2</sup>. Además, el ratio en función de género en ELA familiar es 1:1. Muchos estudios han indicado que el sexo masculino es un factor de riesgo no genético, dado que las poblaciones de pacientes tienen un ratio 3:2 varones:mujeres. Esta diferencia por género, en cualquier caso, no se cumple en todas las poblaciones, y puede depender en la estructura etaria del grupo estudiado, debido a que los varones predominan en los grupos jóvenes de pacientes<sup>3</sup>.

Todos estos datos nos hacen creer que las condiciones fisiológicas moleculares son la principal razón para el desarrollo de esta enfermedad, apuntando a que la genética es la principal vía para mejorar el conocimiento de las causas de la ELA o la DFT. Los avances en el conocimiento de las bases moleculares de la ELA desarrollados en los últimos 25 años se han visto impulsados en gran medida por los avances en las tecnologías de genotipado y secuenciación. Las mutaciones en *SOD1* fueron la primera causa de ELA identificadas<sup>4</sup>, contribuyendo a aproximadamente el 20% de los casos ELAf "fALS" y a un 2% de los casos ELAe "sALS". Más recientemente, las expansiones patogénicas de la repetición de un hexanucleótido localizado en el primer intrón del gen *C9orf72* en el cromosoma 9p21 han sido identificadas como la causa más común de fALS (40%) y sALS (7%)<sup>5,6</sup>.

En este sentido, los estudios en esta patología han entrado en una era radicalmente nueva desde 2007, cuando el grupo de Virginia Lee en la Universidad de Pensilvania, descubrió la estrecha relación entre la ELA y la DFT demostrando la acumulación de una proteína común en las neuronas afectadas en ambas patologías, TDP-43 hiperfosforilada, a través de estudios en necropsias de pacientes<sup>7</sup>. Las inclusiones de tau positivas para ubiquitina y negativas para α-sinucleína son marcas de la degeneración del lóbulo frontotemporal y de la esclerosis lateral amiotrófica.

Junto al excitante descubrimiento de la patología de la TDP-43, tanto los grupos de la Universidad de Pensilvania como los de Montreal (Guy A Rouleau) confirmaron la presencia de mutaciones en el gen *TARDBP* (gen que codifica para la proteína TDP-43) en ambas enfermedades<sup>8,9</sup>.

La búsqueda de mutaciones en una proteína con características similares a la TDP-43, denominada FUS, permitió relacionar un nuevo gen directamente con la ELA<sup>10</sup>,

a loci previously linked to ALS in chromosome 16, using samples of large families from the “Boston family set”<sup>11</sup>. Both, *TARDBP* and *FUS*, are genes related not only with ALS, but also with FTD.

So, in this past decade, most of the new genes found through international collaboration have been related both to ALS and FTD. *TBK1*, *C9orf72*, *CCNF*, *CHCHD10* or *SQSTM1*. Even in the case of some of the genes, the relation with other diseases not so close to the ALS-FTD spectrum have either been demonstrated, such as *VCP* with Paget disease of bone, inclusion body myopathy; or *UBQLN2* with spastic paraplegia, multiple sclerosis; *SQSTM1* with Paget disease of bone; and the most recently discovered in ALS, *Kif5*, causative for two other neurodegenerative diseases, hereditary spastic paraplegia (SPG10) and Charcot-Marie-Tooth Type 2 (CMT2), depending on the location of the mutations throughout the gene<sup>12</sup>.

The collective knowledge gained from genetic factors provides a more comprehensive understanding of the interacting pathways underlying motor neuron degeneration. For example, the identification of ALS genes has revealed at least three pathways believed to contribute to the development of ALS: (1) RNA processing (based on the observation of mutations in *C9orf72*, TDP-43, *FUS*, and *MATR3*); (2) protein homeostasis (*UBQLN2*, *VCP*, *OPTN*, *VAPB*); and (3) cytoskeletal dynamics (*PFN1*, *TUBA4A*, *DCTN1*)<sup>13</sup>.

The social and economic burden due to ALS, and to other neurodegenerative diseases closely related with it is now substantial, but in the coming years it will seriously affect the principal economies of the world. The number of ALS cases across the globe will increase from the approximately current 175,000 to nearly 400,000 in 2040, predominantly due to an aging population<sup>14</sup> and better living conditions in developing countries.

So, the message is clear: “Understanding the mechanisms leading to disease pathogenesis provides targets for therapeutic intervention that may be applicable to all forms of ALS” and the only way to apply the potential therapeutic interventions to all ALS patients is to better interpret the genetic bases of every individual with ALS and to apply potential treatments with this knowledge in a “Personalized Medicine” manner.

## 1.2. TRANSITIONING NEXT-GENERATION SEQUENCING DISCOVERIES IN ALS GENETICS TO THERAPEUTIC TREATMENTS / PROF. JOHN LANDERS

The identification of the genetic causes of ALS is necessary to further our knowledge of the cellular pathways involved in neurodegeneration and contribute towards establishing targets for therapeutic intervention. Our laboratory has a proven history of identifying genes contributing to familial ALS (FALS) using a variety of approaches. We were instrumental towards the identification of *FUS* as a causative gene for FALS using a combination of linkage analysis, homozygosity mapping and high-throughput Sanger sequencing in 2009. Through our long-standing interest of novel technologies, my laboratory employed exome capture and next-generation sequencing to identify mutations in the profilin 1 (*PFN1*) as a cause of FALS in 2012. Furthermore, we have developed extensive collaborations with the leaders of ALS genetic research. As a result, my laboratory now

localizado en un loci asociado previamente a la ELA en el cromosoma 16, empleando muestras de grandes familias del “Boston family set”<sup>11</sup>. Ambos, *TARDBP* y *FUS*, son genes relacionados tanto con la ELA como con la DFT.

Así, en esta última década, la mayoría de los nuevos genes descubiertos gracias a la colaboración internacional han sido genes asociados a ambas enfermedades, a la ELA y la DFT: *TBK1*, *C9orf72*, *CCNF*, *CHCHD10* o *SQSTM1*. Incluso, en el caso de algunos genes, se ha demostrado su relación con otras enfermedades de un espectro no tan próximo como el de la ELA y la DFT, como el gen *VCP* la enfermedad ósea de Paget y la miopatía por cuerpos de inclusión; o *UBQLN2* la paraplejia espástica, esclerosis múltiple; *SQSTM1* con la enfermedad de Paget; y el más reciente descubrimiento en ELA, *Kif5*, causa de otras dos enfermedades neurodegenerativas, paraplejia espástica hereditaria (SPG10) y de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth Tipo 2 (CMT2) en función de la localización de las mutaciones en el gen<sup>12</sup>.

El incremento del conocimiento colectivo sobre los factores genéticos nos aporta un entendimiento mayor de las vías de interacción que subyacen a la degeneración de la motoneurona. Por ejemplo, la identificación de genes de ELA ha revelado al menos tres vías que se cree que contribuyen al desarrollo de esta patología: (1) procesamiento del ARN (basado en la observación de mutaciones en *C9orf72*, TDP-43, *FUS*, and *MATR3*); (2) homeostasis de proteínas (*UBQLN2*, *VCP*, *OPTN*, *VAPB*); y (3) dinámica del citoesqueleto (*PFN1*, *TUBA4A*, *DCTN1*)<sup>13</sup>.

La carga social y económica debida a la ELA, y a otras enfermedades neurodegenerativas ligadas a ella es hoy sustancial, pero en los próximos años afectará seriamente a las principales economías del mundo. El número de casos a nivel mundial se incrementará de los aproximadamente 175.000 a cerca de 400.000 en 2040, a causa principalmente del envejecimiento de la población<sup>14</sup> y de mejores condiciones de vida en los países en desarrollo.

Por tanto, el mensaje es claro: "Entender los mecanismos que subyacen a la patogenia de la enfermedad nos dota de posibles dianas de intervención terapéutica que puedan ser aplicables a todas las formas de ELA" y la única manera de aplicar las potenciales intervenciones terapéuticas a todos los pacientes de ELA es interpretar mejor las bases genéticas de cada individuo con ELA y aplicar estos potenciales tratamientos y este conocimiento a través de fórmulas de "Medicina Personalizada".

## 1.2. CÓMO TRANSFORMAREMOS LOS RESULTADOS EN EL HALLAZGO DE NUEVOS GENES A TRATAMIENTOS TERAPÉUTICOS EN LA ELA

/ PROF. JOHN LANDERS

La identificación de las causas genéticas de la ELA es necesaria para ampliar nuestro conocimiento sobre las vías celulares implicadas en la neurodegeneración y contribuir al establecimiento de dianas para intervenciones terapéuticas. Nuestro laboratorio tiene experiencia acreditada en la identificación de genes involucrados en la ELA familiar (FALS, por sus siglas en inglés) a través de distintas aproximaciones. Fuimos fundamentales en la identificación de *FUS* como gen causante de la ELAf "fALS" empleando en 2009 una combinación de análisis de ligamento genético, mapeo de homocigosidad y secuenciación de alto rendimiento Sanger. Nuestro interés permanente en nuevas tecnologías nos llevó a emplear técnicas de captura de exones y secuenciación de nueva generación para identificar mutaciones en profilina 1 (PFN1) como causa de la ELAf "fALS" en 2012. Además, hemos desarrollado colaboraciones estables con los líderes de la investigación

contains the largest collection of FALS exome data in existence. Recently, we have focused on using rare variant burden analysis (RVB) of exome sequencing results on this cohort to identify novel genes for FALS. In brief, RVB compares the combined frequency of rare variants within all genes in a case-control cohort. Candidate associations are identified by significant differences after multiple test correction. Through our efforts, we initially identified mutations in the TUBA4A gene, which encodes the Tubulin, Alpha 4A protein, are associated with FALS in 2014. To my best knowledge, this published study represents the first successful application of rare variant burden analysis for the discovery of a novel disease gene. Subsequently, we have improved RVB by developing a training session for the analysis with known ALS genes. This innovative method had led us to the identification of a novel risk factor, NEK1 (NIMA-related kinase), that is observed in 3% of ALS patients in 2016. Most recently, we have identified the kinesin family member 5A (KIF5A) as a novel gene associated with ALS through a collaborative effort of two lines of investigation: RVB of 1,138 index familial ALS cases and 19,494 controls and a genome-wide association study comparing 20,806 ALS cases and 59,804 controls. This represents the largest study in ALS genetics.

Lastly, my lab has become more focused recently in the genetic factors contributing to sporadic ALS (SALS). In contrast to FALS, SALS cases represents the vast majority of all ALS cases (90%). Based on the lack of a family history and supported by heritability studies, the genetic contribution of SALS is lower compared to FALS. As a result, it presents a difficult challenge to identify genetic factors contributing to SALS. In fact, it is anticipated that the identification of rare risk factors for SALS will require the WGS of tens of thousands of cases and controls. Such an endeavor is well beyond the capabilities (scientifically and financially) of a single laboratory. As a result of this limitation, the ALS scientific community has created a worldwide consortium called Project MinE. The goal of Project MinE is to WGS the DNA from 15,000 ALS cases and 7,500 controls. Currently 16 countries have joined Project MinE with more to follow. In October 2014, I was appointed as co-Director of the Project MinE effort in the USA (Project MinE USA), along with Dr. Jonathan Glass of Emory University. Our efforts have thus far resulted in the WGS of nearly 600 samples and we anticipate another 800 samples within the next year. Currently, Project MinE has reached nearly one-third of its goal of 22,500 WGS in total. Again, it is our hope that the findings from this effort will further help us to further understand the pathogenesis of ALS.

Determining the pathways contributing to ALS pathogenesis is essential for identifying novel targets for therapeutic intervention. Through our genetics efforts described above, we have identified several genes associated with ALS that are both tightly linked to cytoskeletal stability and dynamics. *PFN1* is crucial for the conversion of monomeric (G)-actin to filamentous (F)-actin. Our efforts have shown that mutations lead to destabilized, insoluble aggregates.

Additionally, mutations in *PFN1* decrease actin bound levels, inhibit axon outgrowth, decrease growth cone size and display a reduced F/G-actin ratio. Similarly, TUBA4A mutants result in altered microtubule polymerization, a destabilized microtubule

genética de la ELA. Como resultado de estas, mi laboratorio dispone actualmente de la mayor colección de datos de exomas de ELAf "fALS". Recientemente nos hemos focalizado en el análisis de carga de variantes raras (RVB) de las secuencias de exomas en esta cohorte, con el fin de identificar nuevos genes en FALS. Concisamente, RVB compara la frecuencia combinada de variantes raras entre todos los genes en cohortes de casos y controles. Los candidatos se identifican por diferencias significativas después de varios test de corrección. A través de estos esfuerzos en 2014 logramos identificar inicialmente mutaciones en el gen *TUBA4A*, que codifica para la proteína tubulina alpha 4A, asociadas con la ELAf "fALS". Hasta donde conozco, la publicación de este estudio representa la primera aplicación exitosa del análisis de carga de variantes raras para el descubrimiento de un nuevo gen relacionado con la enfermedad. Posteriormente, hemos mejorado la técnica RVB desarrollando sesiones formativas sobre genes de ELA conocidos. Esta metodología innovadora nos ha permitido la identificación en 2016 de un nuevo factor de riesgo, *NEK1* (NIMA-related kinase), que aparece en el 3% de los pacientes de ELA. Más recientemente, hemos identificado al miembro 5A de la familia de las kinesinas (*KIF5A*) como un nuevo gen asociado a la ELA a través de esfuerzos colaborativos en dos líneas de investigación: análisis RVB de 1.138 casos de ELA familiar y 19.494 controles y un estudio de asociación amplio del genoma "GWAS" comparando 20.806 casos de ELA y 59.804 controles. Esto representa el mayor estudio de ELA genética.

Finalmente, mi laboratorio se ha focalizado, recientemente, en los factores genéticos que contribuyen a la ELA esporádica (sALS, por sus siglas en inglés). Al contrario que la ELAf "fALS", los casos de ELAe "sALS" representan la inmensa mayoría de todos los casos de ELA (90%). En base a la falta de un historial familiar de ELA y apoyado por estudios de herencia, la contribución de la genética en la ELA esporádica es menor que en las formas familiares. Esto representa un reto mayor de cara a identificar factores genéticos que contribuyen a la ELAe "sALS". De hecho, se anticipa que la identificación de factores de riesgo raros requerirá la secuenciación de genoma completo (WGS) de decenas de miles de casos y controles. Un esfuerzo así superaría las capacidades (científicas y financieras) de un único laboratorio. Como consecuencia de esta limitación, la comunidad científica de la ELA ha creado el consorcio mundial conocido como Proyecto MinE. El objetivo del Proyecto MinE es la secuenciación del genoma completo de 15.000 casos de ELA y 7.500 controles. Actualmente 16 países se han unido al Proyecto MinE y otros les seguirán. En octubre de 2014, fui nombrado co-director del Proyecto MinE en USA, junto al Dr. Jonathan Glass de la Emory University. Nuestros esfuerzos han dado como resultado la secuenciación completa de cerca de 600 muestras a las que se sumarán otras 800 en el próximo año. Actualmente, el Proyecto MinE ha alcanzado cerca un tercio de su objetivo de secuenciar en total 22.500 genomas. Una vez más, esperamos que los resultados de este esfuerzo sirvan para ayudarnos a comprender la patogenia de la ELA.

Determinar las vías que contribuyen a la patogénesis de la ELA es esencial para la identificación de nuevas dianas para intervenciones terapéuticas. A través de todos los esfuerzos en el campo de la genética descritos sobre estas líneas, hemos podido identificar distintos genes asociados a la ELA estrechamente ligados tanto a la estabilidad del citoesqueleto como a su dinámica. *PFN1* es crucial para la conversión de monómeros de (G)-actina en filamentos (F)-actina. Nuestros esfuerzos han mostrado que las mutaciones conducen a desestabilizar sus agregados insolubles.

Adicionalmente, las mutaciones en *PFN1* reducen los niveles de actina ligada, inhibe la extensión del axón y disminuye el tamaño del cono de crecimiento mostrando un ratio F/G reducido. De forma similar, los mutantes de *TUBA4A* muestran una polymerización de microtúbulos alterada, una desestabilización de la red de microtúbulos

network, and altered microtubule dynamics. Most recently, we have identified *KIF5A*, a protein well documented in its role of axonal transport. Interestingly, ALS mutations predominantly result in the truncation of the C-terminal region of the protein responsible for cargo binding. These studies, as well as those of several others, establish that cytoskeletal defects are a major pathway contributing to ALS pathogenesis. Cytoskeletal alterations are also a common pathological feature in ALS patients. A major focus of our laboratory is to further dissect how such alterations lead to disease pathogenesis. Towards this goal, we are currently embarking on several differing research approaches. One such approach is the development of model organisms.

The development of model organisms has proven to be a tremendous resource for the study of human diseases. Towards this end, my laboratory has focused on the development of murine models of ALS based on our identification of mutations in *PFN1* and *TUBA4A*. In collaboration with Dr. Zuoshang Xu at UMass, we have recently completed the development of a transgenic mouse that expresses mutant *PFN1*. Interestingly, this model demonstrates several of the characteristics of ALS, including late onset progressive paralysis, decreased weight, decreased grip strength and motor neuron loss. To date, only the mutant *SOD1* mouse model recapitulates the ALS phenotype observed in humans more faithfully than this mutant *PFN1* mouse model. Currently, in collaboration with Jackson Laboratory, we are developing several lines of inducible transgenic and CRISPR mice for multiple mutations based on the genes we have identified (*PFN1*, *TUBA4A*, *NEK1*, *KIF5A*). Undoubtedly, these mouse models will open up several new avenues of research to further understand the pathogenesis of ALS with a focus on cytoskeletal defects and ALS pathogenesis.

The ultimate goal of disease research is the development of novel or improved therapeutic treatments. Currently, riluzole represents the only therapeutic treatment for ALS patients. Unfortunately, this treatment only results in a minimal increase in the survival for ALS patients (3-6 months). As described above, alterations to cytoskeletal structure and dynamics observed in ALS patients disrupt essential cellular functions which are necessary for the maintenance of motor neurons. Based on these observations, my laboratory has recently begun to focus on identifying potential therapeutic targets that can rescue relevant disease phenotypes by regulating cytoskeletal function. Towards this end, our group is making a collaborative effort to identify therapeutic targets for cytoskeletal defects in ALS. In particular, in collaboration with Dr. Steve Finkbeiner (UCSF), we are using primary rodent neurons that express mutant ALS genes (e.g. *TUBA4A*) as a model of ALS-related cytoskeletal defects using longitudinal imaging to measure survival of individual neurons. Through this approach, we have screened a siRNA library focused on cytoskeletal genes to identify modifiers that can rescue phenotypic defects (survival and neurite extension) observed in these cells. Through our efforts, we identified an siRNA that rescued defects observed in primary neurons expressing mutant *TUBA4A* phenotype. Interestingly, this same siRNA rescued phenotypic defects induced by mutant *PFN1* expressing neurons but also defects in neurons expressing mutant TDP-43, an ALS-associated gene with no direct link to cytoskeletal regulation. These results demonstrate that therapeutics directed against cytoskeletal defects can

y una dinámica de estos alterada. Recientemente, hemos identificado *KIF5A*, una proteína con un rol bien documentado en el transporte axonal. Resulta interesante que las mutaciones predominantes en la ELA dan como resultado el truncamiento de la región C-terminal de la proteína responsable de unión de carga. Estos estudios, así como otros, establecen que los defectos en el citoesqueleto son una vía principal que contribuye a la patogénesis de la ELA. Las alteraciones del citoesqueleto son también características comunes de los pacientes de ELA. Uno de los principales focos de nuestro laboratorio es entender cómo estas alteraciones derivan en la patogénesis de la enfermedad. A este respecto, actualmente nos hemos embarcado en distintas aproximaciones. Una de ellas es el desarrollo de modelos experimentales.

El desarrollo de estos organismos modelo ha demostrado ser una fuente muy importante para el estudio de las enfermedades humanas. Para ello, mi laboratorio se ha focalizado en generar modelos murinos de ELA basados en las mutaciones que hemos identificado en *PFN1* y *TUBA4A*. En colaboración con el Dr. Zuoshang Xu de la UMass, hemos completado, recientemente, el desarrollo de un ratón transgénico que expresa una mutación *PFN1*. Es interesante que este modelo muestra varias de las características de la ELA, incluyendo la parálisis progresiva de inicio tardío, pérdida de peso, descenso de la fuerza de prensión y pérdida de motoneuronas. Hasta la fecha, solo el modelo murino mutante *SOD1* manifiesta el fenotipo de ELA observado en humanos, más fielmente que este modelo mutante *PFN1*. Actualmente, en colaboración con el laboratorio de Jackson, estamos desarrollando distintas líneas de ratón transgénicas inducibles y CRISP para múltiples mutaciones basadas en los genes que hemos identificado (*PFN1*, *TUBA4A*, *NEK1*, *KIF5A*). Sin duda, estos modelos murinos abrirán nuevas vías de investigación para entender la patogénesis de la ELA con el foco puesto en los defectos del citoesqueleto y la patogénesis de la ELA.

El objetivo final de la investigación de la enfermedad es el Desarrollo de nuevos o mejorados tratamientos terapéuticos. Actualmente, el riluzol es el único tratamiento terapéutico para los pacientes de ELA. Desgraciadamente, este fármaco sólo logra un incremento mínimo en la supervivencia de los pacientes (3-6 meses). Como hemos descrito anteriormente, las alteraciones de la estructura del citoesqueleto y su dinámica observada en pacientes de ELA trastorna funciones celulares esenciales que son necesarias para el mantenimiento de las motoneuronas. Basándonos en estas observaciones, mi laboratorio ha empezado recientemente a focalizarse en la identificación de potenciales dianas terapéuticas que puedan rescatar fenotipos relevantes de la enfermedad mediante la regulación de la función del citoesqueleto. Con este fin, nuestro grupo está realizando un esfuerzo colaborativo para identificar dianas terapéuticas para defectos del citoesqueleto en ELA. En particular, en colaboración con el Dr. Steve Finkbeiner (UCSF), estamos empleando modelos de neuronas primarias de ratón que expresan genes de ELA mutados (p.ej.: *TUBA4A*) como modelos de defectos en citoesqueleto relacionados con la ELA, empleando imagen longitudinal para medir la supervivencia de las neuronas individuales. Mediante esta aproximación, hemos cribado una librería de ARNsi (silenciadores) enfocada a genes del citoesqueleto para identificar modificadores que puedan rescatar los defectos fenotípicos (supervivencia y extensión de las neuritas) observados en estas células. A través de nuestros esfuerzos, hemos identificado un ARNsi capaz de rescatar los defectos observados en neuronas primarias que expresan un fenotipo mutante de *TUBA4A*. Curiosamente, este mismo ARNsi realiza esta misma función en defectos inducidos en neuronas que expresan *PFN1* mutante y también los producidos por neuronas que expresan TDP-43 mutante, un gen asociado a la ELA sin enlace directo con la regulación del citoesqueleto. Estos resultados demuestran que te-

extend to additional defects observed in ALS. Testing of the beneficial effects of this siRNA in iPSC from sporadic ALS patients and multiple mouse models of ALS has begun. It is our hope that these screening approaches, as well as others in development, will lead to a therapeutic treatment for all forms of ALS.

### 1.3. GENETIC COUNSELLING COMPLEXITY IN MULTIFACETED DISEASES: ALS AS A CASE / DR. ADOLFO LÓPEZ DE MUNAIN

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease with multiple causes that lead to the death of motor neurons. Between 5-10% of the cases are familial forms linked to mutations in various genes transmitted with dominant inheritance, recessive or linked to the X chromosome. There are more than 25 genes linked to Mendelian forms of the disease; TDP-43, FUS, C9ORF72 and SOD1 are the most frequently encountered. All these genes also act as susceptibility genes in the sporadic forms of the disease. Genetic counseling is a medical act by which it is intended to communicate to a patient or their close relatives, information about the aspects of the disease related to its possible genetic origin in order to know future clinical aspects of the process, the risks of transmission to descendants and clinical expression of the condition in their relatives or descendants as well as the possibilities of avoiding transmission to future generations through prenatal diagnosis and assisted reproduction techniques combined with preimplantational molecular diagnosis.

To date, in the context of ALS, genetic counseling is limited to Mendelian forms, always when there is a mutation whose clinical translation is undoubted, and knowing other important data to interpret, such as penetrance, range of age of onset of the symptoms and phenotypic expression (that can be pure or accompanied by other neurological manifestations such as dementia, myopathy, paraparesia, ataxia, oculomotor or bone alterations, among others).

The neurologist expert in genetic counseling must combine a precise knowledge of the state of the art together with communicative skills that make this act a useful tool for those affected and their families and not a source of additional concern.

In this process, the health professional who performs the genetic counseling must obtain, according to the legal requirements established in Spain by the Patient Autonomy Law (Law 41/2002) and the Biomedical Research Law (Law 14/2007), the informed consent that must record that the patient has fulfilled and understood properly the requirements and conditions for which he is going to carry out a genetic test on himself, to his relatives at risk, or his offspring, either in the form of prenatal or preimplantational diagnosis.

The feasibility and reliability of the molecular studies should be discussed with the patient or their relatives previously to being performed. The objectives should be clearly defined as related to assistance or research, as well as the estimated time to obtain results. Throughout the process it must be totally guaranteed that the consent is signed only after a complete understanding of these aspects, stored as a written record and

rapias dirigidas contra los defectos en el citoesqueleto pueden ser extensivos a otros defectos presentes en la ELA. El examen de los efectos beneficiosos de este ARNSi en iPSC (pluripotenciales inducidas) obtenidas de pacientes de ELA esporádica y en múltiples modelos murinos de ELA ha comenzado. Nuestra esperanza es que estas hipótesis de cribado, así como otras en desarrollo, puedan dar lugar a tratamientos terapéuticos para todas las formas de ELA.

### 1.3. EL CONSEJO GENÉTICO EN LAS ENFERMEDADES POLIÉDRICAS: EL CASO DE LA ELA / DR. ADOLFO LÓPEZ DE MUNAIN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa de causas múltiples que conducen a la muerte de las motoneuronas. Entre un 5-10% de los casos son formas familiares ligadas a mutaciones en diversos genes transmitidos con herencia dominante, recesiva o ligada al cromosoma X. Existen más de 25 genes ligados a formas mendelianas de la enfermedad de los que TDP-43, FUS, C9ORF72 y SOD1 son los más frecuentemente encontrados. Todos estos genes actúan asimismo como genes de susceptibilidad en las formas esporádicas de la enfermedad.

El consejo genético es un acto médico por el que se trata de comunicar a un paciente o a sus familiares cercanos, información sobre los aspectos de la enfermedad relacionados con su posible origen genético de cara a conocer aspectos clínicos futuros del proceso, sobre los riesgos de transmisión a los descendientes y sobre la expresión clínica de la condición en sus familiares o descendientes, así como sobre las posibilidades de evitar la transmisión a futuros descendientes mediante las técnicas de diagnóstico prenatal y reproducción asistida combinadas con el diagnóstico molecular preimplantacional.

Hasta la fecha, en el contexto de la ELA, el consejo genético se limita a las formas mendelianas, siempre cuando existe una mutación cuya traducción clínica es indubitable, y conocidos otros datos importantes para su interpretación, como la penetrancia, el rango de edad de aparición de los síntomas y la expresión fenotípica (que puede ser simple o acompañarse por otras manifestaciones como la demencia, miopatía, paraparesia, ataxia, alteraciones oculomotoras u óseas, entre otras).

El neurólogo experto en consejo genético ha de combinar un conocimiento preciso del estado del arte junto a unas habilidades comunicativas que hagan de este acto una herramienta útil para los afectados y familias y no una fuente de preocupación adicional.

En este proceso, el profesional de la salud que realice el consejo genético, debe obtener, de acuerdo a los requisitos legales establecidos en España en la Ley de Autonomía del Paciente (Ley 41/2002) y la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007), el consentimiento informado que debe dejar constancia de que el paciente ha cumplido y entendido apropiadamente los requerimientos y condiciones por los cuales se le va a realizar una prueba genética a él mismo y a sus familiares en riesgo o a su descendencia, tanto en forma de diagnóstico prenatal o preimplantacional.

La factibilidad y fiabilidad de los estudios moleculares deben ser discutidos con el paciente o su familia antes de ser realizados. Los objetivos deben ser definidos claramente, delimitando si son asistenciales o de investigación, así como realizar una estimación de los períodos de tiempo para la obtención de resultados. En todo momento se debe garantizar que el consentimiento es otorgado tras comprender estos aspectos y que quede constancia escrita de ello, así como guardar la confidencialidad de los datos

with the clinical data and the identity of the patient kept confidential. Sometimes it is necessary to consider special situations arising from complex family situations such as divorced couples, poor relationship with family members who must provide critical information, death of the propositus case, studies to be performed over post-mortem biological samples deposited in biobanks, or studies in asymptomatic children, etc. Each of these situations must be handled in a specific way, taking into account for example, that in the case of asymptomatic children, molecular studies are contraindicated, unless there are specific and special circumstances, considering that in case of doubt or divergence with the legal representatives of the children, an award must be released by the ethics committee or even by a judge, always taking into account the principles of autonomy and beneficence of the patient. Another important aspect to keep in mind, especially in diseases of special severity and late onset, is to perform a psychological assessment test about the capacity of the subject to receive a negative result, assuring psychological support when necessary.

Finally, we must remember that genetic counseling can be modified by further information derived from research issues providing new data of interest for the patient, but outside the focused objectives of the genetic test. The informed consent should therefore reflect the attitude to be followed regarding the communication of unexpected results. To carry out genetic counseling, the professional must be a medical doctor, preferably a specialist in the disease subject matter, but moreover, he/she must have adequate training in genetic counseling.

#### **1.4. HOW WILL GENETIC DISCOVERIES INFLUENCE THE MANAGEMENT OF ALS IN THE FUTURE? / DR. ALBERTO GARCÍA REDONDO**

During the round table, we enjoyed a small discussion about the issues that most concern patients, that is, whether genetics will help them to overcome the disease, whether it can influence the treatments that may exist to fight ALS in the future, and whether their direct relatives can benefit from knowledge of the disease's genetic characteristics.

##### **Are we moving towards personalized medicine in the field of ALS?**

Personalized medicine, or to give it another name, individualized medicine, which guides the treatment of patients according to their genetic and chemical characteristics, is a concept that is increasingly widespread in the world of medicine.

The idea that a disease is homogeneous in all patients has now become redundant. Diseases split and sub-differentiate according to their origin, that is, according to genetic characteristics.

Today, thanks to all the genes that we know are related to ALS, we can be certain that every patient (or rather, every group of patients) will in the immediate future have a treatment, one whose characteristics will be centered on avoiding the toxic effects of the specific genetic mutation that causes the disease in these patients.

This idea was explained in the round table and it was agreed that while it is true that we are moving towards a profile of personalized treatments, we should always consider the following on the way:

- The causes of spread. That is, the reason why, after beginning in a group of motor neurons, the disease gradually makes its way towards the adjacent neurons.

y de la identidad del paciente a lo largo del proceso. Es necesario prever situaciones especiales derivadas de situaciones familiares complejas como parejas divorciadas, escasa relación con miembros de la familia que deben facilitar información crítica, fallecimiento del caso *propositus*, estudios sobre muestras biológicas depositadas en biobancos *post-mortem*, estudios en niños asintomáticos, etc. Cada una de estas situaciones debe ser manejada de forma específica teniendo en cuenta, por ejemplo, que en el caso de niños asintomáticos los estudios moleculares están contraindicados, salvo circunstancias generales, considerando que en caso de duda o divergencia entre los representantes legales de los niños, se recurra a un comité de ética o incluso a un juez, siempre teniendo en cuenta los principios de autonomía y beneficencia del paciente. Otro aspecto importante a tener en cuenta, especialmente en enfermedades de especial severidad y aparición tardía, es llevar a cabo una evaluación psicológica previa que permita valorar la capacidad del sujeto para recibir un resultado negativo, asegurando un apoyo psicológico cuando sea necesario.

Por último, debemos recordar que el consejo genético puede verse modificado por información posterior derivada de resultados de investigaciones que pueden aportar nuevos datos de interés para el paciente, pero fuera de los objetivos del test genético. El consentimiento informado debería reflejar la actitud a seguir respecto a la comunicación de resultados inesperados. Para realizar este consejo genético, el profesional debe ser un médico preferiblemente especialista en la enfermedad materia de consejo, pero además debe tener formación adecuada en asesoramiento genético.

#### **1.4. ¿CÓMO VAN A INFLUIR LOS HALLAZGOS GENÉTICOS EN EL MANEJO DE LA ELA EN EL FUTURO? / DR. ALBERTO GARCÍA REDONDO**

Durante la mesa redonda pudimos disfrutar de un pequeño debate centrado en los temas que más inquietan a los pacientes, es decir, si la genética les va a ayudar a superar la enfermedad, si puede influir en los tratamientos futuros que pueda haber para combatir la ELA, y si sus familiares directos se pueden beneficiar del conocimiento de las características genéticas de la enfermedad.

##### **¿Caminamos hacia la medicina personalizada en el campo de la ELA?**

La medicina personalizada, o dicho de otra forma, la medicina individualizada, que orienta el tratamiento de los pacientes según sus características genéticas y químicas, es un concepto cada vez más generalizado en el mundo de la medicina.

La idea de que una enfermedad es homogénea en todos los pacientes ya ha quedado obsoleta, de modo que las enfermedades se dividen y subdiferencian según su origen, es decir, según las características genéticas.

Hoy en día, y gracias a todos los genes que conocemos relacionados con la ELA, se podría asegurar que cada paciente (o más bien, cada grupo de pacientes) tendrá un tratamiento de cara al futuro próximo, cuyas características se centrarán en evitar los efectos tóxicos de la mutación genética concreta que causa la enfermedad en dichos pacientes.

Esta idea se expuso en la mesa de trabajo y se comentó que, efectivamente, vamos encaminados a ese perfil de tratamientos personalizados, pero que en el camino siempre se deberán tener en cuenta:

- Las causas de la propagación. Es decir, el por qué la enfermedad una vez comienza en un grupo de neuronas motoras, va dirigiéndose, poco a poco, a las neuronas adyacentes.

- The commencement of neurodegeneration begins well before the symptoms are seen. That is, we should remember that patients may be treated prior to the start of the disease, with the aim of preventing it from happening unexpectedly and there being undesirable consequences.

Dr. López de Munain reminded us of Rothman's Theory, which states that there are component causes and sufficient causes.

- Component cause: A cause that contributes in forming a conglomeration that will represent a sufficient cause.
- Sufficient cause: If the factor (cause) is present, the effect (disease) always occurs. It does not require specificity; the same effect can be produced by different sufficient causes. A component cause can form part of more than one sufficient cause to produce the same effect. If one component cause forms part of all the sufficient causes of an effect it is called a necessary cause.

### **Will it be possible to “avoid” the existence of hereditary diseases?**

As we now know, and this was made plain in our debate, ALS is a hereditary disease, except for approximately 10% of cases.

Hereditary cases (familial ALS) and those that are not (sporadic ALS) are indistinguishable from the symptomatological point of view. This is the reason why the study of the genetic causes of the disease (the only ones known at present) can provide a great many clues and be useful for the best ALS diagnosis, prognosis and treatment.

The idea that the birth of children positive for certain mutations can be monitored gives us cause to reflect on whether hereditary diseases (those of genetic origin) will disappear in the future. But in this situation, we should always consider ethical reasons and, in reality, the impossibility of certain types of mutations appearing at random from generation to generation (characteristic of evolution). Therefore, in principle, we should not become too hung up on eliminating these mutated genes before an individual's birth, although it is true that good genetic counselling will enable the most appropriate decisions to be taken prior to conception.

Dr. López de Munain himself reflected on whether ALS should be taken into account when promoting preimplantation diagnosis. Through this type of diagnosis, the genetics of the cells that form the embryo are studied "in vitro", prior to implantation in the womb for which they are intended. In this way, those embryos that do not carry the undesired mutation may be selected, ensuring that the individual to be born will not carry the genetic defect responsible for the disease.

The idea is for the Spanish (and European) public system to encourage the use of this preimplantation diagnostic technique in cases when the disease produced by this gene mutation begins its symptoms in the individual's childhood, adolescence or youth (the fertile stage), rather than in the case of diseases of the "adult" like ALS.

Therefore, it was left on the table, by way of a reflection, whether this type of diagnosis should be considered in the case of these diseases that are more related to the passage of time, such as neurodegenerative diseases.

- El inicio de la neurodegeneración comienza mucho tiempo antes de poder visualizar los síntomas. Es decir, deberemos tener en cuenta que se pueda tratar a los pacientes con antelación al inicio de la enfermedad, con el fin de que esta realmente no sobrevenga y, por tanto, pudieran quedar secuelas no deseadas.

El Dr. López de Munain nos recordaba, según la teoría de Rothman que existen causas componentes y causas suficientes.

- Causa componente: Causa que contribuye a formar un conglomerado que constituirá una causa suficiente.
- Causa suficiente: Si el factor (causa) está presente, el efecto (enfermedad) siempre ocurre. No exige especificidad, un mismo efecto puede ser producido por distintas causas suficientes. Una causa componente puede formar parte de más de una causa suficiente para el mismo efecto. Si una causa componente forma parte de todas las causas suficientes de un efecto se la denomina causa necesaria.

### **¿Será posible "evitar" la existencia de enfermedades de tipo hereditario?**

Como ya sabemos, y en esta jornada quedó llamativamente aclarado, la ELA no es una enfermedad hereditaria, salvo en aproximadamente el 10% de los casos.

Puesto que los casos hereditarios (ELA Familiar) y los que no lo son (ELA esporádica) son desde el punto de vista sintomatológico indistinguibles, esta es la razón por la que el estudio de las causas genéticas de la enfermedad (las únicas actualmente conocidas) puede dar muchas pistas y ser útil tanto para el mejor diagnóstico, como pronóstico y tratamiento de la ELA.

La idea de que se pueda controlar el nacimiento de niños positivos para ciertas mutaciones nos hace pensar si en el futuro las enfermedades hereditarias (de origen genético) desaparecerán. Pero ante esta situación se deben tener en cuenta siempre razones de índole ético y, en realidad, la imposibilidad de que aparezcan ciertos tipos de mutaciones al azar de generación en generación (propio de la evolución). Por lo tanto, en principio, no debemos obsesionarnos con eliminar estos genes mutados antes del nacimiento del individuo, si bien es cierto que un buen Consejo Genético permitirá tomar las decisiones más adecuadas ante la concepción.

El propio Dr. López de Munain estuvo reflexionando sobre si se debería tener la ELA en cuenta a la hora de fomentar el diagnóstico preimplantacional. Mediante este tipo de diagnóstico, se estudia *in vitro* la genética de las células que están formando el embrión, previamente al implante en el útero al que van destinadas. De este modo, se pueden seleccionar aquellos embriones que no porten la mutación no deseada, asegurándonos que el individuo que nacerá no va a portar el defecto genético responsable de la enfermedad.

La idea es que en el sistema público español (y europeo) se favorece esta técnica de diagnóstico preimplantacional en casos en que la enfermedad a la que da lugar dicha mutación génica inicie los síntomas en la infancia, adolescencia o juventud del individuo (época fértil), y no en el caso de las enfermedades del "adulto" como la ELA.

Por tanto, se dejó sobre la mesa, a modo de reflexión, si se deberían tener en cuenta, para este tipo de diagnóstico, estas enfermedades más relacionadas con el paso del tiempo, como son las enfermedades neurodegenerativas.

### **Will it be necessary to carry out massive sequencing in order to generate an appropriate medical opinion?**

Genetic study techniques are increasingly becoming more universal and complex. On the one hand, it is possible to study a greater number of people (these techniques are used all over the world today). In addition, the results arrive in a shorter time (from the 20 years taken to sequence the first human genome to the barely three days in which we can receive the same results today). And finally, the cost of the techniques has dropped so much that compared to the billions needed for the first sequencing, we can today obtain the complete sequence of a person's genome for only 1,000 euros (less than most sophisticated medical tests).

The main problem of this type of study is the excess of information obtained in the results, more than anything because we will receive information related to other issues that in principle we did not want to know in the case of the study being aimed at a specific condition (for example). Above all, it is impossible to discover the individual's future according to all their genetic characteristics and their interaction with the environment, due to the casuistry that this would involve.

Therefore, the idea remains on the table, and the reflection that in the future, although it is highly probable that almost everyone's genomes will be sequenced, the results must be used very carefully for the individual's benefit and improvement of their health. All this will mean a radical change in what we know today as western medicine given that the weight of genetic studies will lie at the heart of the decisions taken about the treatment of each person.

### **Will the treatment of ALS be unique or a cocktail of drugs, cells and gene therapy?**

This is all conjecture but obviously, ALS treatment will not involve, almost certainly, the action of a single drug. Here lies the complexity of the studies and clinical trials that lead to demonstrating whether a single drug has a positive effect on patients.

The disease begins with a cause that leads to the selective neurodegeneration of the motor neurons (those that innervate the muscles). The neurodegeneration process in itself is divided into several stages (which end with the disappearance of the degenerating neuron) and it is precisely the understanding and the study of these stages that is vital for the treatment of the disease.

Taking into account at each stage the effect of a drug (a molecule of industrial and chemical origin), of gene therapy (with an effect aimed more at the initiation phase or prior to the start of neurodegeneration) or of cell therapy (with an effect more aimed at the more advanced phases of the neurodegeneration process, keeping neurons alive, and even replacing some of their functionalities), we should therefore regard the solution to ALS as highly complex and expect mixed therapies to be developed to improve patients' health in the future.

### **¿Será necesario realizar la secuenciación masiva a todo el mundo para poder generar una opinión médica adecuada?**

Las técnicas de estudios genéticos cada vez están alcanzando mayor universalidad y complejidad. Por un lado, se pueden estudiar mayor número de personas (son técnicas utilizadas hoy día en todo el planeta). Además, los resultados llegan en menores intervalos de tiempo (desde los 20 años que llevó la secuenciación del primer genoma humano, a los escasos 3 días en que podemos tener los mismos resultados a día de hoy). Y, por último, el precio de las técnicas se ha reducido de modo que, de los miles de millones que costó la primera secuenciación, hoy podemos obtener la secuencia completa del genoma de una persona por tan sólo 1000 euros (menos que la mayor parte de las pruebas médicas más sofisticadas).

El principal problema de este tipo de estudios resulta en el exceso de información que se obtiene en los resultados del estudio, sobre todo porque tendremos información relacionada con otras cuestiones que no queríamos en principio conocer si el estudio iba dirigido a una enfermedad en concreto (por ejemplo) y, sobre todo, la imposibilidad de conocer el futuro del individuo según todas las características genéticas y su interacción con el medioambiente, debido a la casuística que todo esto conlleva.

Por lo tanto, queda sobre la mesa la idea y la reflexión de que, en el futuro, aunque es muy probable que casi todo el mundo se secuencie el genoma, los resultados del mismo deberán ser muy cuidadosamente utilizados para el bien del individuo y la mejora en su salud. Todo esto supondrá un cambio radical de lo que conocemos hoy en día como medicina occidental, pues el peso de los estudios genéticos supondrá el centro de las decisiones sobre el tratamiento de cada persona.

### **¿El tratamiento de la ELA será único o mediante un cóctel de fármacos, células y terapia génica?**

Esto supone conjeturar al máximo, pero obviamente, el tratamiento de la ELA no será, casi con toda seguridad, la acción de un solo fármaco, y de ahí la complejidad que poseen los estudios y ensayos clínicos que llevan a la demostración de si un único fármaco posee un efecto positivo sobre los pacientes.

La enfermedad se inicia por una causa que lleva a la neurodegeneración selectiva de las neuronas motoras (las que inervan los músculos). El proceso de neurodegeneración en sí mismo se divide además en varias etapas (que terminan con la desaparición de la neurona en degeneración) y, precisamente, la comprensión y el estudio de estas etapas es fundamental para el tratamiento de la enfermedad.

Por tanto, y teniendo en cuenta que en cada etapa el efecto de un fármaco (molécula de origen químico industrial), de la terapia génica (con un efecto más dirigido a la fase de inicio o previa al inicio de la neurodegeneración) o de la terapia celular (con un efecto más dirigido a las fases más avanzadas del proceso de neurodegeneración, manteniendo vivas las neuronas, e incluso sustituyendo algunas de sus funcionalidades) debemos pensar que la solución de la ELA es realmente compleja, y que, en el futuro, se desarrollarán mezclas de terapias para la mejora de la salud de los pacientes.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS / BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Charcot, J.-M. & Joffroy, A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.* 2, 744–760 (1869).
2. Roggenbuck, J., Quick, A. & Kolb, S. J. Genetic testing and genetic counseling for amyotrophic lateral sclerosis: an update for clinicians. *Genet. Med.* 1–8 (2016). doi:10.1038/gim.2016.107
3. Al-Chalabi, A., van den Berg, L. H. & Veldink, J. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. *Nat. Rev. Neurol.* 13, 96–104 (2016).
4. Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62 (1993).
5. Dejesus-hernandez, M. *et al.* Supplemental Information Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. 72,
6. Renton, A. E. *et al.* Supplemental Information A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Nat. Biotechnol.* 72, 1–7.
7. Neumann, M. *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–3 (2006).
8. Van Deerlin, V. M. *et al.* TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol.* 7, 409–16 (2008).
9. Kabashi, E. *et al.* TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 40, 572–4 (2008).
10. Kwiatkowski, T. J. *et al.* Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205–8 (2009).
11. Sapp, P. C. *et al.* Identification of two novel loci for dominantly inherited familial.
12. Nicolas A, Kenna KP, Renton AE, Ticozzi N, Faghri F, Chia R, Dominov JA, Kenna BJ, Nalls MA, Keagle P, Rivera AM, van Rheenen W, Murphy NA, van Vugt JJFA, Geiger JT, Van der Spek RA, Pliner HA, Shankaracharya, Smith BN, Marangi G, Topp SD, Abramzon Y, Gka, L. J. Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. *Neuron*. Mar 21, 1268–1283 (2018).
13. Eykens, C. & Robberecht, W. The genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis: recent breakthroughs. *Adv. Genomics Genet.* 2015, 327–345 (2015).
14. Arthur, K. C. *et al.* Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nat. Commun.* 7, (2016).

## 2. ANIMAL AND CELLULAR MODELS IN ALS

### 2.1. NEW PERSPECTIVES IN CELLULAR AND ANIMAL MODELS OF ALS

/ DR. ANA CRISTINA CALVO

The future identification of the etiopathogenesis in ALS disease will be crucial to understand disease pathogenesis. The successful generation of good animal and stem cell-derived models, especially those underlying C9-FTD/ALS pathogenesis, will open the door to more effective therapeutic strategies. The development of the CRISPR/Cas9 tool can help in the advancement of new model systems in neuroscience, especially in ALS. The CRISPR/Cas9 system is able to introduce mutations in one or two alleles to mimic heterozygous or homozygous knock-outs of a given gene. A null mutation in the model organism is obtained when both alleles are targeted<sup>1</sup>.

Recent studies have confirmed the utility of this system in modeling neurodegenerative diseases. The CRISPR/Cas9 system has been successfully used for engineering the pig genome to generate a human Parkinson's disease model. In addition, genetically modified cynomolgus monkey has also been obtained using this system, although further studies need to be performed to understand the effect of this genetic modification in this animal<sup>1</sup>.

In the context of ALS, recent studies have been conducted to develop transgenic ALS models, confirming that CRISPR/Cas9 system holds great promise for a simple, feasible, and inexpensive method for generating model systems. In relation to zebrafish models, homology-directed repair (HDR) following CRISPR/Cas9 enabled the generation of knock-in lines that imitated disease-causing point mutations in humans using zebrafish TARDBP<sup>A379T</sup> (TARDBP<sup>A382T</sup>) and FUS<sup>R536H</sup> (FUS<sup>R521H</sup>). However, CRISPR/Cas9-mediated HDR can be problematic due to its low efficiency and therefore novel approaches need to be developed. The expression of a human gene with diminished homology to the ortholog in a phylogenetically distant species might be insufficient and too biased to reflect the human disease<sup>2</sup>. CRISPR technology has been also used to develop pathogenic variants of ALS in mice. C9orf72-deficient mice<sup>3</sup>, IGF1-knocked-down SOD1<sup>G93A</sup> mice<sup>4,5</sup> have been successfully generated. These findings are very promising because ALS mice treated by CRISPR/Cas9 showed an increased survivability of motor neurons, delayed disease onset, and a prolonged lifespan compared to controls, especially in SOD1-linked forms, revealing the potential use of CRISPR/Cas9 tool for the treatment of SOD1-linked forms of ALS and other neurodegenerative diseases<sup>1,5</sup>.

Remarkably, iPSC-derived motor neurons are valuable cellular models of neurodegenerative disorders and are a novel genome engineering tool.

The applicability of the CRISPR/Cas9 system for studying a "disease in a dish" that employs the patient's own iPSCs has been tested in the field of ALS. iPSC-derived C9orf72 motor neurons have been repaired by excision of the mutation using CRISPR/

## 2. MODELOS ANIMALES Y CELULARES EN LA ELA

### 2.1. NUEVAS PERSPECTIVAS EN MODELOS CELULARES Y ANIMALES DE ELA

/ DR. ANA CRISTINA CALVO

La identificación futura de la etiopatogenia de la ELA será crucial para entender la patogénesis de esta enfermedad. El éxito en la generación de modelos animales y modelos derivados de células madre, especialmente aquellos basados en la patogénesis C9-DFT/ELA, pueden ser la base de nuevas estrategias terapéuticas más efectivas. El desarrollo del sistema CRISPR/Cas9 también puede ayudar en el avance sobre nuevos modelos en neurociencias, especialmente en ELA. El sistema CRISPR/Cas9 es capaz de introducir mutaciones en uno o dos alelos para mimetizar homocigotos o heterozigotos knock-out en un gen determinado. La mutación completa en el organismo modelo se obtiene cuando ambos alelos son modificados<sup>1</sup>.

Estudios recientes han confirmado la utilidad de este sistema en el estudio de enfermedades neurodegenerativas. CRISPR/Cas9 ha sido empleado con éxito en el genoma porcino para generar un modelo de enfermedad de Parkinson. En particular, en primates, el mono cynomolgus ha sido genéticamente modificado usando este sistema, aunque son necesarios nuevos estudios que permitan entender el efecto de estas modificaciones genéticas en estos animales<sup>1</sup>.

En el contexto de la ELA, se ha demostrado recientemente en modelos transgénicos de ELA que el sistema CRISPR/Cas9 tiene un gran potencial como método simple, factible y barato para el desarrollo de estos modelos. En pez cebra la aplicación de la técnica de reparación dirigida por homología (homology-directed repair o HDR) y de CRISPR/Cas9 ha permitido la generación de líneas knock-in que imitan mutaciones puntuales causantes de la enfermedad en humanos como por ejemplo TARDBP<sup>A379T</sup> (TARDBP<sup>A382T</sup>) y FUS<sup>R536H</sup> (FUS<sup>R521H</sup>). No obstante, la HDR mediada por CRISPR/Cas9 puede ser problemática debido a su baja eficiencia y, por tanto, se necesita mejorar esta metodología a fin de incrementar su eficiencia. Por otro lado, la expresión de genes humanos con escasa homología a los de estas especies tan filogenéticamente distantes, puede no ser suficiente y demasiado sesgado para reflejar la enfermedad en humanos<sup>2</sup>. El sistema CRISPR se ha empleado con éxito en ratones SOD1<sup>G93A</sup> en los que se ha silenciado el gen IGF-1 con el fin de desarrollar nuevos modelos murinos de ELA<sup>3,4,5</sup>. Estos hallazgos son muy prometedores ya que los ratones en los que se ha utilizado este sistema CRISPR/Cas9 muestran una mayor viabilidad de sus motoneuronas, un retraso en el inicio de la enfermedad, y una mayor esperanza de vida en comparación con los animales control, especialmente en formas ligadas a SOD1, lo que revela el uso potencial de la herramienta CRISPR/Cas9 para el tratamiento de estas formas de ELA ligadas a SOD1 y otras enfermedades neurodegenerativas<sup>5,1</sup>.

Por otro lado, resulta interesante resaltar la relevancia de los modelos celulares de motoneuronas derivadas de células madre pluripotenciales inducidas (iPS, induced pluripotent stem cells) como modelos de enfermedades neurodegenerativas utilizando nuevas herramientas de ingeniería genética.

La aplicabilidad del sistema CRISPR/Cas9 en lo que conocemos como “disease in a dish” y que emplea las propias células iPS del paciente, ha sido ya testada en el campo de la ELA. Las motoneuronas C9ORF72 derivadas de iPS se han conseguido reparar por escisión de la mutación empleando el sistema CRISPR/Cas9, lo que ha posibilitado un

Cas9 to better understand the pathological mechanisms involved in the disease<sup>6</sup>. Furthermore, Ca<sup>2+</sup> homeostasis and the metabolism of anti-apoptotic protein Bcl-2 is being investigated in this cellular model<sup>6</sup>. iPSC-derived motor neurons from familial ALS patients bearing SOD1<sup>+/A272C</sup> and FUS<sup>+/G1566A</sup> mutations have been corrected using CRISPR technology, identifying molecular hallmarks associated with early pathological events of motor neuron<sup>7</sup>.

The application of the CRISPR/Cas9 system has currently two main purposes in the therapy of ALS. One approach is based on using CRISPR technology as a gene therapy for inherited ALS, delivering RNA in order to reduce C9orf72 expression. The second approach is based on the meaningful potential of neurotrophic factors to exert neuro-protective effects on damaged motor neurons in both familial and sporadic ALS cases. Recent findings suggest that genetically modified mesenchymal stem cells (MSCs) using CRISPR technology can steadily express neurotrophic factors that could enhance neuroprotective effects on impaired motor neurons<sup>8</sup>.

Current research on this innovative genome editing tool has laid the groundwork for future clinical work in ALS. The CRISPR/Cas9 technology has emerged as a feasible tool to achieve what has seemed impossible for decades. The use of this technology to treat ALS is very promising and gives enormous hope to patients suffering from ALS. Although this technology is currently restricted to reducing the expression of mutant proteins in inherited cases of ALS in mice, the system might bring crucial breakthroughs in familial and sporadic cases of the disease in a near future.

## 2.2. VARIABILITY IN ALS DISEASE PROGRESSION: INSIGHTS FROM MUTANT SOD1 MOUSE MODELS / DR. CATERINA BENDOTTI

ALS is a debilitating disease characterized by progressive paralysis, which ultimately leads to death within 3-5 years from diagnosis. However, there is considerable heterogeneity in the course of the disease, with some patients showing an extremely rapid decline and death within 2 years whilst others show a much slower disease progression with survival times extending over a decade from symptom onset, even in the presence of same genetic mutations, i.e. SOD1 linked familial ALS. This makes any assessment of treatment response in clinical trials really difficult, in the absence of reliable estimates of prognosis. Most importantly, identification of potential modifiers of the disease course may provide new targets for the development of therapies.

Similar to the heterogeneity of phenotype in patients with SOD1 FALS pedigree, genetic background can have a significant effect on disease phenotype variability also in mouse models of ALS. In fact, the widely used mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) transgenic mice carrying the SOD1G93A mutation, surrogates of human pathology, exhibit a marked variability in the disease course depending on their genetic background. For example, we found that when the SOD1G93A transgene is expressed in C57BL6 congenic background the phenotype is mild with a slower disease progression than in the congenic 129Sv mice expressing the same amount of transgene but showing faster progression and shorter lifespan. Therefore, we focused our attention in understanding the causes of this different phenotype in the perspective of identifying potential modifiers as druggable targets and staging-disease biomarkers to be eventually translated into the clinical practice.

mejor entendimiento de los mecanismos patológicos implicados en la enfermedad<sup>6</sup>. Además, en estos modelos celulares se está investigando la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> y el metabolismo de la proteína anti-apoptótica Bcl-2<sup>6</sup>. De forma similar, las motoneuronas derivadas de células iPS de pacientes de ELA familiar portadores de mutaciones SOD1<sup>+/A272C</sup> y FUS<sup>+G1566A</sup> se han corregido empleando el sistema CRISPR/Cas9, identificando de esta forma, huellas moleculares asociadas a la aparición de mecanismos patológicos tempranos en las motoneuronas<sup>7</sup>.

La aplicación del sistema CRISPR/Cas9 tiene actualmente dos propósitos terapéuticos en la ELA. Uno de ellos se basa en el empleo de la tecnología CRISPR como terapia génica en las formas familiares de ELA para reducir la expresión, por ejemplo, de *C9ORF72*. Por otro lado, esta tecnología se ha utilizado para potenciar el efecto neuroprotector de los factores neurotróficos sobre las motoneuronas dañadas tanto en casos de ELA familiar como en ELA esporádica. Recientemente, se ha descrito que las células madre mesenquimales (MSCs, mesenchimal stem cells) genéticamente modificadas mediante CRISPR pueden expresar de forma continuada factores neurotróficos que podrían mejorar los efectos neuroprotectores en las motoneuronas dañadas<sup>8</sup>.

Las investigaciones actuales sobre esta herramienta innovadora de edición génica han sentado las bases para futuros trabajos de investigación clínica en ELA. La tecnología CRISPR/Cas9 emerge como una herramienta muy prometedora para lograr lo que ha resultado imposible durante décadas.

## 2.2. VARIABILIDAD DE LA PROGRESIÓN DE LA ELA: PERSPECTIVAS DERIVADAS DE MODELOS DE RATÓN SOD1 / DRA. CATERINA BENDOTTI

La ELA es una enfermedad degenerativa que se caracteriza por una parálisis progresiva que produce como resultado la muerte en un periodo de entre 3-5 años desde el diagnóstico. Sin embargo, hay una considerable heterogeneidad en el curso de la enfermedad. Algunos pacientes muestran un declive extremadamente rápido con una supervivencia no superior a los dos años, mientras que otros muestran una progresión mucho más lenta con tiempos de supervivencia que se extienden hasta la década desde la aparición de los síntomas, incluso en presencia de las mismas mutaciones genéticas, como por ejemplo en el caso de la ELA familiar (FALS) asociada a SOD1. Esto hace que la evaluación de la respuesta al tratamiento en ensayos clínicos sea realmente compleja, en ausencia de un pronóstico más temprano y fiable. Consecuentemente, la identificación de marcadores potenciales relacionados con el curso de la enfermedad podría facilitar nuevas dianas para el desarrollo de terapias.

De manera similar a la heterogeneidad fenotípica en pacientes de ELA familiar que presentan mutaciones en la SOD1, el *background* genético puede tener un efecto significativo en la variabilidad del fenotipo en modelos murinos de ELA. De hecho, el ratón transgénico mutante para superóxido dismutasa 1 (SOD1) más empleado, portador de la mutación SOD1G93A y mejor caracterizado para la enfermedad en humanos, exhibe una marcada variabilidad en el curso de la enfermedad dependiendo de su fondo genético. Por ejemplo, cuando el transgén SOD1G93A se expresa en ratones C57BL6 el fenotipo resultante es menos severo y de progresión más lenta que en ratones 129Sv, que muestran una progresión más rápida y una esperanza de vida menor a pesar de expresar el mismo transgén. Por tanto, resulta necesario entender las causas de los distintos fenotipos con la perspectiva de identificar biomarcadores más fiables como dianas terapéuticas en los distintos estadios de la enfermedad para poder trasladarlos a la práctica clínica.

We found that while the extent of spinal motor neuron (MN) death at different disease stages is similar between the two models, specific alterations occurring in motor neurons at disease onset are fundamental in dictating the subsequent course of the disease. In particular, the capacity of motor neurons to activate immunological, angiogenic and anti-oxidative processes seems to promote neuroprotective responses in the motor neuron itself and in the neighborhood environment that are associated with slower disease progression. In contrast, when these mechanisms are less robustly activated as in the 129Sv-SOD1G93A mice, a massive impairment of mitochondrial function, protein catabolic processes and axonal function are associated with a more aggressive disease course. Accordingly, the MNs of mice with early onset and fast progression show more abundant protein aggregates associated with low basal expression of chaperones and proteasome subunits compared with late onset and slow progressing mice. This phenomenon was detectable not only in the vulnerable region of spinal cord, but also in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of mutant SOD1 mice, suggesting that a different ability to upregulate mechanisms involved in proteostasis may be at the basis of a different severity of ALS.

Interestingly, we found a higher reduction of chaperones, an index of impaired proteostasis, also in the PBMC of early onset as compared to late onset patients with ALS, suggesting that this can be a characteristic trait of the patients with an earlier and more severe disease. This may represent a potential valid prognostic biomarker for the stratification of patients entering into clinical trial and for the development of therapeutic approaches aiming at boosting the protein quality control system.

Another major difference between the two mouse models was observed in the morphology and functionality of the motor axonal compartment at both central and peripheral level of the nervous system. In particular, the peripheral motor axons of the sciatic nerves and the neuromuscular junctions (NMJ) were more severely affected in 129Sv-SOD1G93A compared with C57-SOD1G93A mice at the onset of symptoms, predicting a faster disease progression in the first strain. We have examined the causes of this phenomenon, demonstrating an important role of mechanisms associated with the immune response mediated by major histocompatibility complex 1 (MHCI), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), also known as CCL2, and the complement C3 that were markedly upregulated in the sciatic nerves of slow rather than in fast disease progressing mice. This effect was responsible for a massive infiltration of CD8+ T lymphocytes and macrophages in the peripheral nerves of slow but not fast-progressing mice. Such process is considered to be essential for the removal of defective motor fibers expressing axon growth inhibitors (e.g. myelin debris). This would then promote the de-differentiation and proliferation of Schwann cells (SCs) to create a growth-permissive milieu to support axon regrowth and preserve motor axon activity.

En primer lugar, las alteraciones específicas que se muestran al inicio de la enfermedad en las motoneuronas son fundamentales para condicionar el curso de la enfermedad, a pesar de que ambos modelos animales, 129Sv-SOD1G93A y C57-SOD1G93A, muestran una disminución progresiva similar de motoneuronas a lo largo de la enfermedad. En particular, la capacidad de las motoneuronas de activar procesos inmunológicos, angiogénicos y anti-oxidativos parece promover respuestas neuroprotectoras en las propias motoneuronas y en el ambiente cercano, respuestas que están asociadas a un progreso más lento de la enfermedad. Por el contrario, cuando estos mecanismos no se activan tan intensamente, como en el ratón 129Sv-SOD1G93A, se produce un deterioro masivo de la función mitocondrial, del proceso de catabolismo de las proteínas y de la función axonal que se asocia con un curso más agresivo de la enfermedad. Por tanto, las motoneuronas de los ratones que presentan un inicio temprano y un progreso más rápido muestran también agregados de proteína más abundantes asociados con una expresión basal menor de chaperonas y subunidades de proteosoma, comparadas con las observadas en ratones que debutan de forma tardía y con una progresión más lenta. Estas alteraciones se detectaron no sólo en la médula espinal, sino también en células mononucleares en sangre periférica (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) de ratones mutantes SOD1, lo que sugiere que la distinta activación de estos fenómenos moleculares de regulación proteica podría ser la base de esa distinta severidad en estos modelos de ELA.

Curiosamente, encontramos una mayor reducción de chaperonas, una deficiente regulación proteica también cuando comparamos las PBMC de pacientes con inicio temprano con las de pacientes de ELA con inicio tardío, lo que nos sugiere que esto puede ser un rasgo característico de los pacientes con inicio temprano y una mayor severidad de la enfermedad. Esta desregulación proteica podría representar un biomarcador de pronóstico en potencia, válido para la estratificación de pacientes en ensayos clínicos y para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas dirigidas a estimular el sistema de control de calidad de proteínas.

Otra diferencia importante entre ambos modelos de ratón fue observada en la morfología y funcionalidad del compartimento axonal motor tanto a nivel del sistema nervioso central como del periférico. En concreto, se observó que los axones periféricos motores de los nervios ciáticos y de las uniones neuromusculares (NMJ, neuromuscular junction) estaban afectados de forma más severa en ratones 129Sv-SOD1G93A al compararlos con ratones C57-SOD1G93A al inicio de los síntomas, favoreciendo una progresión más rápida de la enfermedad en ratones 129Sv-SOD1G93A. Hemos examinado las causas de este fenómeno, demostrando el importante papel de los mecanismos asociados con la respuesta inmune mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad 1 (MHC1, major histocompatibility complex), la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1, monocyte chemoattractant protein 1), también conocida como CCL2, y el complemento C3 que aparecen activadas de forma más marcada en los nervios ciáticos de los ratones de progresión lenta frente a los de progresión rápida. Por otro lado, esta activación causó la infiltración masiva de linfocitos T CD8+ y macrófagos en los nervios periféricos de los ratones de progresión lenta pero no en los de progresión rápida. Este proceso se considera esencial para eliminar las fibras motoras defectuosas expresando inhibidores del crecimiento del axón (como por ejemplo, residuos de mielina), pudiendo promover una desdiferenciación y proliferación de las células de Schwann (SCs, Schwann cells) que crearía un entorno más favorable al crecimiento de los axones y la preservación de la actividad motora axonal.

This protective effect of immunity may explain the failure, or the poor efficacy, of various anti-inflammatory and immuno-suppressor treatments in patients and mouse models and suggest the importance of identifying molecular signatures as potential disease biomarkers for homogeneous subsets of ALS patients

### 2.3. NLRP3 AS A MOLECULAR MARKER IN AN ANIMAL MODEL OF ALS

/ DR. ROSARIO OSTA

Several studies suggest that neuroinflammation could play a role in the dissociation of the neuromuscular junction during the progression of ALS<sup>9</sup>. However, the exact mechanisms that can trigger this process of neuroinflammation remain unknown.

A characteristic inflammatory response has been observed in patients and animal models of ALS. This response can be divided into two stages: an early neuroprotective stage and a subsequent neurotoxic stage<sup>10,11</sup>. Previous studies suggest that microglia and astrocytes change from a neuroprotective phenotype to a pro-inflammatory one (reactive glia) that releases potentially neurotoxic cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). In this sense, it has been described that patients that exhibit a rapid progression of the disease also show a decreased number of neuroprotective regulatory T cells, enhancing neurotoxicity<sup>11</sup>.

The activation of the innate immune reaction in ALS can be triggered by various cellular pathways after the recognition of certain signals of tissue damage, such as molecular patterns associated with pathogens (PAMPs) and molecular patterns associated with damage (DAMPs). In recent years, special attention has been given to cytosolic protein complexes, known as inflammasomes, which act as intracellular sensors. Among the different types of inflammasomes, the best characterized is the NLRP3 inflammasome, composed of the NLRP3 protein, the adapter protein associated with apoptosis (ASC) and pro-caspase-1. The NLRP3 inflammasome is activated in response to numerous PAMPs and DAMPs, including bacterial RNA and toxins,  $\beta$ -amyloid and mitochondrial reactive oxygen species (mROS)<sup>12,13</sup>. Recently, several studies have shown an activation of NLRP3 in the spinal cord of the SOD1G93A mouse model and in sporadic ALS patients<sup>14</sup>, the expression of NLRP3 together with high levels of IL-18 have been detected in the brain of patients with ALS<sup>15</sup> and an amelioration of disease progression in SOD1G93A mice with lower levels of CASPASA 1 or IL-1 $\beta$  has also been described<sup>16,17</sup>. However, the role of the NLRP3 inflammasome in ALS needs to be elucidated.

Our main aim was based on the study of the NLRP3 inflammasome in skeletal muscle, liver and spleen of transgenic animals SOD1G93A, a murine model of ALS, to finally translate this study to blood samples from patients in order to identify new prognostic biomarkers of ALS.

In a first step, we analyzed the gene and protein expression profiles of the NLRP3 inflammasome components in the quadriceps, liver and spleen of transgenic animals SOD1G93A and healthy animals (WT) of 50 days (asymptomatic stage), 75 days (early symptomatic stage) and 120 days of age (terminal stage), thus monitoring the evolution of these markers along the disease progression. The results showed a significant activation at the protein level of all the components of the inflammasome in the terminal stage, in quadriceps of transgenic animals, while in liver and spleen, only the

Este efecto protector de la inmunidad puede explicar el fallo, o la disminuida eficacia, de varios antiinflamatorios e inmunosupresores en pacientes y modelos animales y permite sugerir la importancia de identificar dianas moleculares como potenciales biomarcadores de enfermedad para conjuntos homogéneos de pacientes de ELA.

### 2.3. NLRP3 COMO MARCADOR MOLECULAR EN MODELOS ANIMALES DE ELA

/ DRA. ROSARIO OSTA

Numerosos estudios sugieren que la neuroinflamación puede jugar un papel relevante en la destrucción de la unión neuromuscular durante la progresión de la ELA<sup>9</sup>. Sin embargo, los mecanismos exactos que desencadenan este proceso de neuroinflamación permanecen desconocidos.

Se ha descrito en pacientes y modelos animales de ELA una respuesta inflamatoria característica. Esta respuesta puede ser dividida en dos estadios: en una etapa temprana de neuroprotección y en una fase subsiguiente neurotóxica<sup>10,11</sup>. Estudios previos sugieren que la microglía y los astrocitos cambian de un fenotipo neuroprotector a un fenotipo pro-inflamatorio (glía reactiva), liberando citoquinas potencialmente neurotóxicas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). En este sentido, se ha descrito que pacientes que presentan una rápida progresión de la enfermedad también muestran un número reducido de células T regulatorias neuroprotectoras, mejorando la neurotoxicidad<sup>11</sup>.

La activación de la reacción innata del sistema inmune en ELA puede ser desencadenada por varias vías celulares tras el reconocimiento de ciertas señales de daño tisular, como patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados con el daño (DAMPs). En los últimos años se ha prestado especial atención a los complejos citosólicos de proteína, conocidos como inflamósomas, que actúan como sensores intracelulares. Entre los distintos tipos de inflamósomas, el mejor caracterizado es el inflamósoma NLRP3, compuesto por la proteína NLRP3, la proteína adaptadora asociada con la apoptosis (ASC) y pro-caspasa-1. El inflamósoma NLRP3 se activa en respuesta a numerosos PAMPs y DAMPs, incluyendo RNA bacteriano y toxinas,  $\beta$ -amiloido y especies de oxígeno reactivas mitocondriales (mROS)<sup>12,13</sup>. Recientemente, muchos estudios han mostrado una activación de NLRP3 en la médula espinal del modelo de ratón SOD1G93A y en pacientes de ELA esporádica<sup>14</sup>. Se ha observado en el cerebro de pacientes de ELA un aumento en la expresión de NLRP3 además de niveles altos de IL-18<sup>15</sup>, mientras que se ha demostrado una mejora de la progresión de la enfermedad en ratones SOD1G93A que expresan bajos niveles de CASPASA 1 o IL-1 $\beta$ <sup>16,17</sup>. Sin embargo, todavía son necesarios más estudios para esclarecer el papel del inflamósoma NLRP3 en ELA.

Nuestro objetivo principal en este estudio se basó en el análisis del inflamósoma NLRP3 en músculo esquelético, hígado y bazo de animales transgénicos SOD1G93A, un modelo murino de ELA, con el fin de trasladar este estudio a muestras de pacientes para identificar nuevos biomarcadores de pronóstico en ELA.

En un primer paso analizamos los perfiles de expresión de genes y proteínas que componen el inflamósoma NLRP3 en el cuádriceps, hígado y bazo de animales transgénicos SOD1G93A y animales sanos (WT) de 50 días (estadio asintomático), 75 días (estadio sintomático temprano) y 120 días de edad (estadio terminal), monitorizando la evolución de estos marcadores a lo largo de la progresión de la enfermedad. Los resultados mostraron una activación significativa a nivel proteico para todos los componentes del inflamósoma en el estadio terminal, en cuádriceps de animales transgénicos, mien-

protein levels of some components of the inflammasome (ASC and Caspase-1 in liver, ASC in spleen) were found significantly increased in transgenic animals in relation to the healthy ones.

Considering these results that suggested that the muscle could be a more sensitive tissue to the activation of the inflammasome along the disease progression, in a second study performed on serial muscle biopsies obtained from the animal model, the gene expression of all the components of the NLRP3 inflammasome was analyzed, and finally these levels of expression were correlated with the longevity of the animals. Only in the case of NLRP3, the gene expression levels of this marker correlated positively with the longevity of the animals; in other words, the animals that showed a shorter survival also showed lower NLRP3 levels.

Finally, in blood samples from ELA patients, the NLRP3 marker was tested in order to check if it also showed a similar profile pattern to the one observed in serial muscle biopsies from the animal model. The gene expression of NLRP3 was significantly higher in ALS patients than in healthy controls and, in addition, the gene levels correlated negatively with the ALSFRS-r scale; in other words, patients that showed high NLRP3 levels in blood, also showed lower ALSFRS-r scores, suggesting that the NLRP3 expression could be used as a biomarker of support for diagnosis.

Future studies are needed to study in depth the role of NLRP3. A higher number of samples as well as performing serial blood samples from patients are also needed in order to validate the possible prognostic nature of the expression of this gene. Taken together, these findings provide an important first step towards the discovery of novel biomarkers of ALS and may be the initial step forward for new clinical trials and promising therapeutic strategies.

#### **2.4. NEW ANIMAL MODELS FOR ALS DISEASE AND NEW INSIGHTS ABOUT INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS IN ALS / DR. ANA CRISTINA CALVO**

##### **Evolution of cellular and animal models for ALS**

As we said in the first chapter, the identification of the genetic causes of ALS is necessary to further our knowledge of the cellular pathways involved. The increasing number of genes identified in ALS can enhance understanding of the disease although the lack of a clear pathogenesis has hampered the design of effective therapies. In this sense, the suitability of currently used cellular and animal models of disease relating to the human disease is still under debate. This is an important issue because the likelihood of a successful clinical outcome for a given treatment in ALS could depend on the similarity of the model to the disease as well as the biologic action of the potential therapeutic agent. Let us revise in depth the wide variety of experimental models for ALS to tackle their relevance in the study of ALS.

##### **Classical cellular and animal models**

*In vitro* systems offer a manipulation that cannot be attained in live animals. The most widely *in vitro* models used include isolated motor neuron cultures, organotypic cultures, the spinal cord and neuroblastoma hybrid cell line NSC-34, the myoblast cell line

tras que en el hígado y bazo sólo los niveles de algunos componentes del inflamósoma mostraron un incremento significativo en animales transgénicos frente a los hallados en animales sanos (ASC y Caspasa-1 en hígado, ASC en bazo).

Considerando estos resultados que sugerían que el músculo es un tejido más sensible a la activación del inflamósoma durante la progresión de la enfermedad, en un segundo estudio realizado en biopsias seriadas de músculo obtenido del modelo animal, analizamos la expresión de todos los componentes del inflamósoma NLRP3 y, finalmente, correlacionamos estos niveles de expresión con la longevidad de los animales. Sólo en el caso de NLRP3, los niveles de expresión génica de este marcador mostraron una correlación positiva con la longevidad de los animales. En otras palabras, los animales que mostraron una menor supervivencia también mostraron bajos niveles de NLRP3.

Finalmente, testamos en muestras de sangre de pacientes de ELA el marcador NLRP3 con el fin de verificar si también se mostraba un patrón similar al observado en las biopsias seriadas de músculo de los modelos animales. Los niveles de expresión génica de *NLRP3* fueron significativamente mayores en pacientes de ELA que en controles sanos y, además, los niveles genéticos se correlacionaban negativamente con la escala ALSFRS-r; es decir, los pacientes con valores altos de NLRP3 en sangre, también mostraban bajos valores en la escala ALSFRS-r, sugiriendo que la expresión de NLRP3 puede ser empleada como biomarcador de soporte al diagnóstico.

Nuevos estudios son necesarios para analizar en profundidad el papel de *NLRP3*. Por otro lado, y con el fin de validar la posible naturaleza pronóstica de la expresión de este gen, será necesario incluir un mayor número de muestras además de nuevos estudios que permitan el análisis de muestras de sangre seriadas de pacientes. En conjunto, estos hallazgos constituyen un primer paso importante hacia el descubrimiento de nuevos marcadores en ELA y pueden ser el paso inicial hacia nuevos ensayos clínicos y estrategias terapéuticas prometedoras.

## 2.4. NUEVOS MODELOS ANIMALES DE ELA Y NUEVAS PERSPECTIVAS EN CÉLULAS MADRE PLURIPOENTES INDUCIDAS / DRA. ANA CRISTINA CALVO

### Evolución de modelos celulares y animales de ELA

Como hemos visto en el primer capítulo, el incremento del número de genes identificados en ELA puede ayudar a entender la enfermedad a pesar de que la falta de una patogénesis clara ha obstaculizado el diseño de terapias efectivas. En este sentido, el uso de modelos celulares y animales adecuados para lograr una cura en la enfermedad es un tema actualmente en debate. Este aspecto es importante dado que la probabilidad de obtener resultados positivos para un tratamiento en ELA podría depender de lo representativo que sea el modelo de la enfermedad y de la acción biológica del agente terapéutico empleado. A continuación revisaremos en profundidad la amplia variedad de modelos experimentales para ELA con el fin de abordar su relevancia en el estudio de esta patología.

### Modelos celulares y animales clásicos

Los sistemas *in vitro* ofrecen una posibilidad de manipulación que no se puede alcanzar en animales vivos. Los modelos *in vitro* más extendidos incluyen cultivos de motoneuronas aisladas, cultivos organotípicos, líneas celulares híbridas NSC-34 de médula espinal y neuroblastoma y líneas celulares de mioblastos C2C12. Todos ellos comparten

C2C12. All of them share an easy manipulation and they also show some special features. The most direct *in vitro* method is offered by motor neuron cultures from mouse embryos or differentiated from embryonic stem cells. These cells can unlimitedly be expanded and stored as homogeneous populations and they are also suited for drug screening, proteomics, and biochemistry<sup>19</sup>. The main concern is based on the fact that these cells are in their immature state. Consequently, they have limited applications when studying motor neuron degeneration since the interaction between motor neurons and other neurons and glia cannot be analyzed in a realistic manner. In addition, these motor neurons need the temporally regulated bidirectional interactions with muscle cells to engage maturation processes<sup>19,20</sup>. On the other hand, primary cultures from spinal cord of mouse models have been fully differentiated *in vivo* before being dissociated from the spinal cord. However, these primary cultures often face variable contamination with other cell types, and they are harder to obtain rather than embryonic cell cultures.

Another alternative approach to harvesting primary spinal motor neurons is as a form of organotypic spinal cord slices. The organotypic cultures enable some preservation of *in vivo* cell-cell interactions. In particular, in spinal cord organotypic slices, the preservation of neuron-glial interactions can promote significant astrogli and microglial proliferation that mimics to some extent the remarkable changes observed in tissue from both ALS patients and mutant SOD1 transgenic mouse. Noteworthy, these slices can serve as a ready-to-use platform for investigating neural networks by electrophysiological recording<sup>18</sup>. However, as it is the case with motor neuron cultures, multiple axotomies are performed to obtain these slices, leaving the tissue shut out from the messages it receives to the organs when the animal is still alive<sup>19</sup>.

Motor neurons and muscle cultures based on NSC34 and C2C12 cell lines offer a closer step to the *in vivo* models, providing a dynamic scenario to characterize cellular and molecular mechanisms involved in the pathogenesis of the disease and to test potential therapeutic treatments. Additionally, the effect of mutant proteins related to familial cases of ALS can be monitored in these cultures to understand the different capacity of response of motor neurons and/or skeletal muscle. In accordance with this fact, the effect of mutant genes related to familial cases can be analyzed. As an example, the familial ALS protein mutant SOD1 (mutant superoxide dismutase 1) clearance was found to be more active in muscle cells derived from C2C12 cell line than in motor neurons derived from NSC34 cell line, suggesting that muscle cells seem to manage misfolded mutant SOD1 more efficiently than motor neurons<sup>21</sup>.

While cellular models represent the earlier targets for drug discovery, the therapeutic strategies tested in clinical trials are mainly based on preclinical research on animal models. Animal models offer the main advantage and at the same time the high complexity of exploring a disease mechanism and even the effect of a potential treatment in the whole and alive organism without any axotomy. In this sense, these models provide a more realistic landscape of the disease. Invertebrate models using *Saccharomyces cerevisiae*<sup>22</sup>, *Drosophila melanogaster*<sup>23</sup>, and *Caenorhabditis elegans*<sup>24</sup> have

la fácil manipulación y muestran algunas características especiales. El método más directo *in vitro* lo ofrecen los cultivos de motoneuronas obtenidas de embriones de ratón o las células madre embrionarias diferenciadas. Estas células pueden ser expandidas y almacenadas ilimitadamente como poblaciones homogéneas y son también adecuadas para la selección de fármacos, estudios proteómicos y bioquímicos<sup>18</sup>. La principal desventaja se basa en el hecho de que estas células se encuentran en un estado muy inmaduro. Por tanto, tienen aplicaciones limitadas para el estudio de la degeneración de la motoneurona puesto que la interacción entre las motoneuronas y otras neuronas y la glía no puede ser analizada de forma realista. Además, las motoneuronas necesitan para llevar a cabo su proceso de maduración interacciones bidireccionales reguladas temporalmente con las células musculares<sup>19,20</sup>. Por otra parte, los cultivos primarios de médula espinal de modelos animales tienen que ser totalmente diferenciados *in vivo* antes de ser disociadas de la médula espinal. Sin embargo, estos cultivos primarios muestran frecuentemente contaminaciones variables de otros tipos celulares, y son más difíciles de obtener que los cultivos celulares embrionarios.

Otra aproximación alternativa al cultivo de motoneuronas espinales primarias son los cultivos organotípicos de médula espinal. Estos cultivos organotípicos permiten cierta preservación de las interacciones célula-célula *in vivo*. En particular, en los cultivos organotípicos de médula espinal la preservación de las interacciones neurona-glía puede promover la proliferación significativa de la astroglía y la microglía imitando en cierta medida los cambios notables observados en el tejido de pacientes de ELA y ratones transgénicos SOD1. Estos cultivos pueden servir como plataformas *listos para usar* para la investigación de redes neurales mediante registros electrofisiológicos<sup>18</sup>. Sin embargo, como ocurre en el caso de los cultivos de motoneuronas, para obtener estos cultivos se han de realizar numerosas axotomías, dejando el tejido aislado de la comunicación que recibe de los órganos cuando el animal está aún vivo<sup>19</sup>.

Los cultivos de motoneuronas y fibras musculares basados en líneas celulares NSC34 y C2C12 ofrecen un paso más hacia los modelos *in vivo*, facilitando un escenario dinámico para caracterizar los mecanismos celulares y moleculares envueltos en la patogénesis de la enfermedad y en el que testar potenciales tratamientos terapéuticos. Además, en estos cultivos se puede monitorizar el efecto de proteínas mutantes relacionadas con los casos de ELA familiar con el fin de entender la distinta capacidad de respuesta de las motoneuronas y/o el músculo esquelético. En este sentido, podemos analizar el efecto de genes mutantes relacionados con las causas familiares de la enfermedad. Como ejemplo, se encontró que la eliminación de la proteína mutante de ELA familiar SOD1 (superóxido dismutasa 1 mutante) es más activa en células musculares derivadas de líneas celulares C2C12 que en motoneuronas derivadas de líneas celulares NSC34, sugiriendo que las células musculares parecen regular de forma más eficiente la proteína mutante SOD1 mal plegada que las neuronas motoras<sup>21</sup>.

Mientras los modelos celulares constituyen los primeros pasos para el descubrimiento de fármacos, el diseño de estrategias terapéuticas en ensayos clínicos se basa principalmente en investigación preclínica realizada sobre modelos animales. Los modelos animales ofrecen como principal ventaja y al mismo tiempo como mayor complejidad, la posibilidad de explorar los mecanismos de enfermedad e incluso los efectos de un tratamiento potencial en un organismo vivo sin axotomía. En este sentido, estos modelos proporcionan un marco de la enfermedad más realista. Los modelos de invertebrados basados en *Saccharomyces cerevisiae*<sup>22</sup>, *Drosophila melanogaster*<sup>23</sup>, y *Caenorhabditis elegans*<sup>24</sup> han dado lugar a diversos hallazgos, aunque los modelos de vertebrados permiten resultados más trasladables a la patología humana debido a su

yielded various insights, although vertebrate models in general provide more translatable results to human disease because of their increased genetic homology. During the 1990s, three naturally occurring ALS models were identified, characterized and used for preclinical testing of treatments. These mouse models, the pmn<sup>25</sup>, the wobbler<sup>26</sup> and the nmd mice<sup>27</sup> showed a phenotype characterized by a forelimb and/or hindlimb progressive weakness to paralysis, and even motor neuron degeneration in the spinal cord, hypoglossal nuclei, and motor cortex, especially in the nmd mice. Considering that for these models, the temporal course (nmd), spatial patterns (mnd), or pathology (pmn) is quite dissimilar from what is observed in ALS patients, a major difficulty that arose with these models was to predict a successful outcome in clinical trials with any degree of confidence<sup>28</sup>. This difficulty was overcome by the generation of transgenic models.

Genetically modified mouse models are the most widely used animal models in ALS, showing the possibility of moving a step back and investigating the *in vitro* cell cultures from these models. Nevertheless, the experiments planned in these models are time consuming and represent a high cost for maintenance. Among the wide variety of transgenic mouse models, transgenic superoxide dismutase (SOD1) mice have been and are being extensively used and better characterized to study the disease in an *in vivo* approach. The most used mutant SOD1 mice include transgenic G93A, G37R, G85R and G86R mice that overexpress these SOD1 mutations related to familial ALS cases. These mutant mice develop weakness usually beginning in the hindlimbs and motor neuron loss that progresses over weeks to months eventually resulting in death, depending on the levels of mutant SOD1 expressed. On pathologic examination, motor neurons from spinal cord and skeletal muscle become lost and atrophied, respectively, resembling the neurodegenerative pathology observed in sporadic and familial cases<sup>28</sup>. Although these mutant mice are an invaluable model for testing potential therapeutic agents in ALS, they are not representative of ALS in general. Consequently, the generation of new animal models have paved the way to a new challenge to unravel the disease at preclinical level.

Based on the aberrant RNA processing, rodent models of ALS-FUS (Fused-in-Sarcoma), provide clues to the pathomechanistic role of (FUS) and its significance in the neurodegeneration of human disease<sup>29</sup>. Similarly, transgenic TDP-43 mice that overexpress 43-kDa TAR DNA-binding protein (TDP-43) show alterations with RNA processing, which is accompanied with cytoplasmic accumulation of TDP-43 in neurons, a pathological hallmark related to sporadic and familial cases<sup>30</sup>. The main point is that when TDP-43 autoregulation is perturbed, a gain of TDP-43 function appears and splicing of Mapt (microtubule associated protein tau) becomes altered, underpinning ALS and Frontotemporal Dementia (FTD) since Mapt is another pivotal dementia-associated gene. A very recent work describes a TDP-43 misregulation as a pathogenic mechanism in a novel TDP-43 knock-in mouse, carrier of a human-equivalent mutation in the endogenous mouse Tardbp gene, the TDP<sup>43Q331K</sup> mice that show cognitive dysfunction with lack of motor impairment, reinforcing the connection between ALS and FTD<sup>31</sup>.

Since the identification of an expansion of a noncoding GGGGCC ( $G_4 C_2$ ) hexanu-

mayor homología genética. Durante los años noventa se identificaron, caracterizaron y emplearon para ensayos preclínicos tres modelos murinos de ELA naturales. En estos modelos murinos, el ratón pmn<sup>25</sup>, el ratón wobbler<sup>26</sup> y el ratón nmd<sup>27</sup> mostraban un fenotipo caracterizado por una debilidad progresiva de las extremidades anteriores y/o posteriores que conducía a la parálisis, e incluso una degeneración neuronal en la médula espinal, los núcleos hipoglosos y la corteza motora, especialmente en el ratón nmd. Teniendo en cuenta que en estos modelos el curso temporal (nmd), los patrones espaciales (mnd) o la patología (pmn) son bastante distintos a los observados en los pacientes de ELA, predecir la utilidad de los resultados en ensayos clínicos con algún grado de confianza reviste una gran dificultad<sup>28</sup>. La generación de modelos transgénicos supuso finalmente un avance en este sentido.

Los modelos de ratón genéticamente modificados son los modelos animales más ampliamente empleados en la ELA, con la posibilidad además de dar un paso atrás e investigar *in vitro* sobre cultivos celulares obtenidos a partir de estos modelos. Sin embargo, los experimentos planteados en estos animales suelen ser lentos y representan un alto coste de mantenimiento. Entre la amplia variedad de modelos murinos transgénicos el más extensamente empleado y mejor caracterizado para estudiar la ELA, bajo una aproximación *in vivo*, es el ratón transgénico que sobreexpresa la superóxido dismutasa (SOD1) mutada. Los ratones mutantes para SOD1 más empleados incluyen los transgénicos G93A, G37R, G85R y G86R que sobreexpresan estas mutaciones SOD1 ligadas a casos de ELA familiar. Estos ratones mutantes desarrollan una debilidad que empieza habitualmente en las extremidades traseras y una pérdida de motoneuronas que progresa durante semanas y hasta meses dando como resultado la muerte, en función de los niveles de SOD1 mutante expresada. Un examen patológico muestra que las motoneuronas de la médula espinal y el músculo esquelético se pierden y atrofian, respectivamente, de forma parecida a la patología neurodegenerativa observada en los casos de ELA esporádica y familiar<sup>28</sup>. Aunque estos modelos murinos mutantes son modelos de inestimable valor a la hora de testar nuevas estrategias terapéuticas para la ELA, no son representativos de todos los casos de ELA. Como consecuencia, la generación de nuevos modelos animales ha allanado el camino a un nuevo desafío para desentrañar la enfermedad a nivel preclínico.

Con respecto al procesamiento aberrante del RNA, los modelos murinos ELA-FUS (Fused-in-Sarcoma) pueden proporcionar información sobre el papel de FUS en los mecanismos patogénicos y su implicación en la neurodegeneración como ocurre en la patología humana<sup>29</sup>. De forma análoga, el ratón transgénico que sobre expresa la proteína de unión a DNA TAR 43-kDa (TDP-43) presenta alteraciones en el procesado del RNA, mostrando la acumulación de esta proteína en el citoplasma de las neuronas, que es un signo patológico relacionado con los casos de ELA esporádica y familiar<sup>30</sup>. El aspecto más destacado se basa en que cuando se modifica la autorregulación de TDP-43, aparece una ganancia de la función de esta proteína y se altera el splicing de la proteína Mapt (proteína tau asociada a microtúbulos), fundamental en la ELA y la Demencia Frontotemporal (DFT) ya que se ha visto que Mapt juega un papel crucial en la demencia. Un estudio muy reciente describe la desregulación de TDP-43 como un mecanismo patogénico en un nuevo modelo murino knock-in para TDP-43, portador de una mutación equivalente a la humana en el gen *Tardbp* endógeno de ratón. Este ratón TDP<sup>43Q331K</sup> muestra una disfunción cognitiva sin presentar deterioro a nivel motor, reforzando la idea de conexión entre la ELA y la FTD<sup>31</sup>.

Desde que la expansión de repeticiones de hexanucleótidos no codificantes GGGGCC ( $G_4C_2$ ) en el gen *C9ORF72* se demostró fuertemente asociada con la ELA en

cleotide repeat in the gene *C9ORF72* that was strongly associated with ALS disease in a large FTD/ALS kindred, this *C9ORF72* repeat expansion has become the most common genetic abnormality in both FTD and ALS. This study was the starting point of the generation of the last recent animal models of ALS. Several animal models have been produced to reduce the expression of genes orthologous to *C9orf72*, supporting that loss of function could contribute to the disease process. Knockout of the *C. elegans* ortholog of *C9orf72* (ALFA-1) reproduced an age-related paralysis phenotype. Injection of antisense morpholino oligonucleotides during zebrafish development shortened motor neuron axons and prompted motor phenotype. Different strategies, including CRISPR/Cas9 technology, were effective in reducing the expression of the mouse ortholog of *C9orf72* (3110043O21Rik) in a tissue-specific or in a ubiquitous manner. However, in all the cases not only neurodegeneration was not present in response to partial or complete loss of *C9orf72* function, but also no mislocalisation of TDP-43 was observed, suggesting that loss of *C9orf72* function could not be sufficient to cause disease<sup>32</sup>.

Contrary to the loss of function hypothesis, overexpressed GGGGCC repeats have been inserted in cell cultures, *C. elegans*, Zebrafish, and *Drosophila* models, providing evidence that *C9orf72* mutation associated with toxic gain of function is sufficient to prompt disease. In the case of mouse models of *C9orf72* expansions, the observed phenotypes were significantly different, either using overexpression of hexanucleotide repeats or integration of human bacterial artificial chromosomes (BACs) containing expanded hexanucleotide DNA, probably due to the different genetic backgrounds. Despite this, the expression of hexanucleotide RNA can lead to behavioral and motor abnormalities underpinned by neurodegeneration. Due to the fact that mice either displayed TDP-43 inclusions or increased TDP-43 phosphorylation, a gain of function alone is sufficient to drive pathogenesis, in which TDP-43 pathology is also present<sup>32</sup>.

It is important to highlight that cellular and animal models of familial ALS cases can be created by genetic manipulations (overexpression, siRNA knockout, CRISPR/Cas9 knock-in or knock-out) of embryos, cell lines or primary rodent cell cultures from existing animal models. However, in relation to sporadic cases there is no way of reproducing the disease in a non-disease model just because of the genetic and epigenetic heterogeneity of sporadic patients, and/or a confluence of small changes that prompt a wide range of disease phenotypes. This complex scenario emphasizes the need for patient-derived models, which offer the most applicable tool for a better understanding of the disease and more efficient therapeutic strategies, since current models compromise in at least one area of human pathophysiology. This point is precisely the essence of novel experimental models of ALS.

### **Induced pluripotent stem cells in modelling ALS**

The discovery of Yamanaka factors in 2006 has enabled a paradigm shift in the in vitro approach to ALS<sup>33</sup>. Under appropriate conditions, induced pluripotent stem cells (iPSCs) can be differentiated into any cell type that were previously unobtainable in

distintas cohortes de pacientes con DFT y ELA, estas expansiones *C9ORF72* han sido descritas como las anomalías más comunes en ambas patologías. Este estudio fue el punto de partida de la generación de los modelos animales de ELA más recientes. De hecho, se han generado diversos modelos animales para reducir la expresión de genes ortólogos a *C9orf72*, apoyando la teoría de que la pérdida de función podía contribuir al proceso de la enfermedad. En modelos invertebrados, el knock-out para el ortólogo de *C9orf72* en *C. elegans* (ALFA-1) reproduce un fenotipo de parálisis ligada a la edad. Por otro lado, la inyección de oligonucleótidos antisentido durante el desarrollo del pez cebra induce un acortamiento de los axones de sus motoneuronas y un fenotipo motor. Sin embargo, distintas estrategias, incluyendo la tecnología CRISPR/Cas9, han sido efectivas en la reducción del ortólogo de *C9orf72* en modelos murinos (3110043O21Rik) y en tejidos específicos o de manera global. Sin embargo, en ninguno de los casos se observó presencia de neurodegeneración en respuesta a la pérdida parcial o completa de función de *C9orf72*, ni se pudo observar una deslocalización de TDP-43 a nivel celular, sugiriendo que la pérdida de función de *C9orf72* puede no ser suficiente para causar la enfermedad<sup>32</sup>.

De forma contraria a la hipótesis que apoya la pérdida de función, la sobreexpresión de repeticiones GGGGCC en cultivos celulares de modelos de *C. elegans*, pez cebra y *Drosophila*, evidencia el hecho de que la mutación *C9orf72* asociada a una ganancia tóxica de su función es suficiente para promover la enfermedad.

En el caso de los modelos murinos de *C9orf72*, los fenotipos observados fueron significativamente distintos entre los generados empleando la sobreexpresión de repeticiones de hexanucleótidos y aquellos sobre los que se integraron cromosomas artificiales bacterianos humanos (CABs) que contenían expansiones de hexanucleótidos de DNA, probablemente debido al diferente fondo genético. A pesar de ello, la expresión de hexanucleótidos de RNA puede conducir a anomalías relacionadas con la neurodegeneración. Debido al hecho de que estos ratones muestran alternativamente inclusiones de TDP-43 o incrementos de la fosforilación de la TDP-43, una ganancia de función por sí sola es suficiente para dar lugar a la patogénesis, en la cual la patología de TDP-43 se encuentra también presente<sup>32</sup>.

Es importante resaltar que los modelos celulares y animales de ELA familiar pueden ser creados por manipulación genética (sobreexpresión, knock-out mediante siRNA, knock-in o knock-out mediante CRISPR/Cas9) en embriones, líneas celulares o cultivos celulares primarios de modelos animales preexistentes. Sin embargo, en relación a los casos de ELA esporádica, no es posible reproducir la enfermedad, debido a la heterogeneidad genética y epigenética de los pacientes de ELA esporádica, y/o a la confluencia de pequeñas alteraciones, incluso ambientales, que promueven una amplia variedad de fenotipos de la enfermedad. Este escenario complejo enfatiza la necesidad de disponer de modelos derivados de pacientes, los cuales representan la mejor herramienta para una mayor comprensión de la enfermedad y para diseñar nuevas estrategias terapéuticas más eficientes, ya que los modelos actuales no son totalmente representativos de la fisiopatología humana. Es en este aspecto donde precisamente radica la importancia de generar nuevos modelos experimentales en ELA.

### **Células madre pluripotentes inducidas en el modelado de la ELA**

El descubrimiento de los factores de Yamanaka, en 2006, ha permitido un cambio de paradigma en los modelos *in vitro* a la ELA<sup>33</sup>. Bajo condiciones apropiadas, las células madre pluripotenciales inducidas (induced pluripotent stem cells, iPS) pueden ser diferenciadas a cualquier tipo celular, proceso que hasta entonces resultaba inalcanzable.

sufficient quantity or quality. Disease-related phenotypes in patient iPSC-derived cells bring new opportunities to study sporadic and familial forms of ALS. The development of iPSC technology makes it possible to acquire disease-specific cell lines that are undoubtedly helpful for unraveling the neurodegenerative disease etiology and pursuing potential treatments, providing a better predictive value than current animal and cellular models.

Many of the studies performed in this field have been focused on the differentiation of iPSCs into motor neurons from familial cases carrying the TDP-43, FUS mutation or the C9orf72 repeat expansion<sup>35,36,37</sup>. The differentiation processes have been successfully achieved. The pathophysiological changes observed in the derived motor neurons, such as sensitiveness to cellular stress or susceptibility to DNA damage, were similar to the ones observed in ALS patients and correlated with the clinical severity of ALS. In addition, human iPSC-derived neural progenitors can successfully survive transplantation into both wild-type and ALS-like environments in gray matter and continued to progressively differentiate into human mature neurons in transgenic SOD1 rats<sup>37</sup>.

Last but not least, several types of antisense oligonucleotids (ASOs) have been used for drug screening to find possible therapeutic treatments in iPSCs-derived neurons. Preliminary results suggest that incubation with ASOs can reduce C9orf72 in iPSC-derived C9orf72 motor neurons<sup>36</sup>. This promising technology is also extended to astrocytes and oligodendrocytes. Sporadic ALS iPSCs-derived astrocytes and oligodendrocytes have been successfully obtained and the effects of these non-neuronal cells have been described, suggesting that they can induce hyperexcitability and death in motor neurons. These findings highlight that these non-neural cells were damaged earlier than motor neurons and consequently a non-specific effect of ALS astrocytes could possibly trigger degeneration on motor neurons<sup>38,39</sup>.

The use of iPSC-derived neurons and non-neuronal cells is undoubtedly a promising step for clinical treatment. However further studies will show the potential action of these stem cells.

Los fenotipos relacionados con la enfermedad en iPS derivadas de células de pacientes nos brindan nuevas oportunidades para estudiar tanto las formas esporádicas como las familiares de la ELA. El desarrollo de las iPS hace posible adquirir líneas celulares específicas de la enfermedad, las cuales representan una ayuda indudable para descifrar la etiología de las enfermedades neurodegenerativas y buscar tratamientos potenciales, mejorando el valor predictivo de los modelos animales y celulares actuales.

Muchos de los estudios realizados en este campo se han focalizado en la diferenciación de iPS en motoneuronas de casos familiares de ELA portadores de mutaciones TDP-43, FUS o *C9ORF72*<sup>34,35,36</sup>. El proceso de diferenciación se ha logrado con éxito. Los cambios fisiopatológicos observados en las motoneuronas obtenidas, como son la sensibilidad al estrés celular o la susceptibilidad al daño en el ADN, fueron similares a los observados en los pacientes de ELA y se correlacionaban con la severidad de la clínica de la ELA. De forma adicional, los progenitores neuronales humanos derivados de estas iPS pueden sobrevivir con éxito al ser trasplantados en la materia gris y continuar diferenciándose de manera progresiva en neuronas maduras humanas en ratas transgénicas SOD1<sup>37</sup>.

Por último pero no por ello menos importante, muchos tipos de oligonucleótidos antisentido (ASOs) han sido empleados en la selección de fármacos para encontrar posibles tratamientos terapéuticos en neuronas derivadas de iPS. Los resultados preliminares sugieren que la incubación con ASOs puede reducir la expresión de la mutación *C9ORF72* en motoneuronas derivadas de iPS<sup>36</sup>. Esta prometedora tecnología se está extendiendo también a los astrocitos y a los oligodendrocitos. Se ha logrado obtener astrocitos y oligodendrocitos derivados de iPS de ELA esporádica, sugiriendo que pueden inducir en las motoneuronas una hiperexcitabilidad y finalmente, la muerte neuronal. Estos hallazgos apuntan a que estas células no neuronales se dañan con anterioridad a las motoneuronas y que, como consecuencia de esto, estos astrocitos dañados en la ELA podrían promover degeneración de las motoneuronas<sup>38,39</sup>.

El uso de neuronas y células no neuronales derivadas de iPS es, sin duda, un paso prometedor para el tratamiento a nivel clínico. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios que demuestren la acción potencial de estas células madre.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS / BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Kruminis-Kaszkiel E, Juranek J, Maksymowicz W, Wojtkiewicz J. The cluster CRISPR/Cas9 Technology as an Emerging Tool for Targeting Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Int J Mol Sci.* 2018, 19(3). pii: E906. doi: 10.3390/ijms19030906.
2. Armstrong GA, Liao M, You Z, Lissouba A, Chen BE, Drapeau P. Homology Directed Knockin of Point Mutations in the Zebrafish *tardbp* and *fus* Genes in ALS Using the CRISPR/Cas9 System. *PLoS ONE* 2016, 11, e0150188.
3. Sullivan PM, Zhou X, Robins AM, Paushter DH, Kim D, Smolka MB, Hu F. The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. *Acta Neuropathol. Commun.* 2016, 4(1), 51. doi: 10.1186/s40478-016-0324-5.
4. Lin H, Hu H, Duan W, Liu Y, Tan G, Li Z, Liu Y, Deng B, Song X, Wang W, et al. Intramuscular Delivery of scAAV9-hIGF1 Prolongs Survival in the hSOD1G93A ALS Mouse Model via Upregulation of D-Amino Acid Oxidase. *Mol. Neurobiol.* 2016, 55, 1-14.
5. Gaj T, Ojala DS, Ekman FK, Byrne LC, Limsirichai P, Schaffer DV. In vivo genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS. *Science Advances.* 2017, 3(12), eaar3952. doi:10.1126/sciadv.aar3952.
6. Mutihac R, Ababneh N, Scaber J, Wade-Martins R, Cowley S, Talbot K. Modelling amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using mutant and CAS9/CRISPR-corrected motor neurons from patients with C9ORF72 mutations reveals disease-specific cellular phenotypes. *J. Neurol. Sci.* 2015, 357 (Suppl. 1), e48.
7. Wang L, Yi F, Fu L, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted gene correction in amyotrophic lateral sclerosis patient iPSCs. *Protein & Cell* 2017, 8(5), 365-378. doi:10.1007/s13238-017-0397-3.
8. Van den Akker G, van Beuningen H, Blaney Davidson E, van der Kraan P. CRISPR/CAS9 mediated genome engineering of human mesenchymal stem cells. *Osteoarthr. Cartel.* 2016, 24, S231.
9. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, Shaw PJ, Simmons Z, van den Berg LH.. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2017, 3, 1-18.
10. Gravel M, Béland LC, Soucy G, Abdelhamid E, Rahimian R, Gravel C, Kriz J. IL-10 Controls Early Microglial Phenotypes and Disease Onset in ALS Caused by Misfolded Superoxide Dismutase 1. *J. Neurosci.* 2016, 36(3): 1031-1048.
11. Hooten KG, Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* 2015, 12(2), 364-375. doi:10.1007/s13311-014-0329-3.
12. Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben, C. & Baune, B. T. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review. *Front. Neurosci.* 2014, 8, 315. doi: 10.3389/fnins.2014.00315.
13. Walsh JG, Muruve, DA, Power, C. Inflammasomes in the CNS. *Nat. Publ. Gr.* 2014, 15, 1-14.
14. Johann S, Heitzer M, Kanagaratnam M, Goswami A, Rizo T, Weis J, Troost D, Beyer C. NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *Glia* 2015, 63(12), 2260-2273.
15. Kadhim H, Deltenre P, Martin JJ, Sébire G. In-situ expression of Interleukin- and associated mediators in the human brain of sALS patients: Hypothesis for a role for immune-inflammatory mechanisms. *Med. Hypotheses* 2016, 86, 14-17.
16. Meissner F, Molawi, K. & Zychlinsky, A. Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-

- $\alpha$ beta accelerates ALS pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2010, 107, 13046-50.
17. Heitzer M, Kaiser S, Kanagaratnam M, Zendedel A, Hartmann P, Beyer C, Johann S. Administration of  $17\beta$ -Estradiol Improves Motoneuron Survival and Down-regulates Inflammasome Activation in Male SOD1 (G93A) ALS Mice. *Mol. Neurobiol.* 2017, 54(10), 8444-8446. doi: 10.1007/s12035-017-0391-z.
  18. Magloire V, Streit J. Intrinsic activity and positive feedback in motor circuits in organotypic spinal cord slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* 2009, 30: 1487-1497. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06978.x.
  19. Buccchia M, Merwin SJ, Re DB, Kariya S. Limitations and Challenges in Modeling Diseases Involving Spinal Motor Neuron Degeneration in Vitro. *Front. Cell Neurosci.* 2018, 12, 61. doi: 10.3389/fncel.2018.00061.
  20. Shi L, Fu AK, Ip NY. Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci.* 2012, 35(7), 441-53. doi: 10.1016/j.tins.2012.04.005.
  21. Crippa V, Galbiati M, Boncoraglio A, Rusmini P, Onesto E, Giorgetti E, Cristofani R, Zito A, Poletti A. Motoneuronal and muscle-selective removal of ALS-related misfolded proteins. *Biochem Soc Trans.* 2013, 41(6), 1598-604. doi: 10.1042/BST20130118.
  22. Ju S, Tardiff DF, Han H, Divya K, Zhong Q, Maquat LE, Bosco DA, Hayward LJ, Brown Jr RH, Lindquist S, et al. A yeast model of FUS/TLS-dependent cytotoxicity. *PLoS Biol.* 2011, 9, e1001052. doi:10.1371/journal.pbio.1001052.
  23. Cauchi RJ, van den Heuvel M. The Fly as a Model for Neurodegenerative Diseases: Is It Worth the Jump?. *Neurodegenerative Dis.* 2006, 3, 338-356. doi: 10.1159/000097303.
  24. Murakami T, Yang SP, Xie L, Kawano T, Fu D, Mukai A, Bohm C, Chen F, Robertson J, Suzuki H, et al. ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism. *Hum Mol Genet.* 2012, 21, 1-9. doi:10.1093/hmg/ddr417.
  25. Schmalbruch H, Jensen HJ, Bjaerg M, Kamieniecka Z, Kurland L. A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1991, 50, 192-204.
  26. Mitsumoto H and Bradley WG. Murine motor neuron disease (the Wobbler mouse). Degeneration and regeneration of the lower motor neuron. *Brain* 1982, 105, 811-834.
  27. Cook SA, Johnson KR, Bronson RT, Davisson MT. Neuromuscular degeneration (nmd): A mutation on mouse chromosome 19 that causes motor neuron degeneration. *Mammal. Genome* 1995, 6, 187-191.
  28. Elliott JL. Experimental Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 1999, 6, 310-320.
  29. Nolan M, Talbot K, Ansorge O. Pathogenesis of FUS-associated ALS and FTD: insights from rodent models. *Acta Neuropathol. Comm.* 2016, 4, 99. doi: 10.1186/s40478-016-0358-8.
  30. Gu J, Wu F, Xu W, et al. TDP-43 suppresses tau expression via promoting its mRNA instability. *Nucleic Acids Research.* 2017, 45(10), 6177-6193. doi:10.1093/nar/gkx175.
  31. White MA, Kim E, Duffy A, Adalbert R, Phillips BU, Peters OM, Stephenson J, Yang S, Massenzio F, Lin Z, Andrews S, Segonds-Pichon A, Metterville J, Saksida LM, Mead R, Ribchester RR, Barhom Y, Serre T, Coleman MP, Fallon J, Bussey TJ, Brown RH Jr, Sreedharan J. TDP-43 gains function due to perturbed autoregulation in a Tar-dbp knock-in mouse model of ALS-FTD. *Nat Neurosci.* 2018, 21(4), 552-563. doi: 10.1038/s41593-018-0113-5.

32. Moens TG, Partridge L, Isaacs AM. Genetic models of C9orf72: what is toxic? *Current Opinion in Genetics & Development* 2017, 44, 92-101.
33. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006, 126, 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
34. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008, 321, 1218-1221.
35. Higelin J, Demestre M, Putz S, et al. FUS mislocalization and vulnerability to DNA damage in ALS patients derived hiPSCs and aging motoneurons. *Front Cell Neurosci* 2016, 10, 290. doi: 10.3389/fncel.2016.00290.
36. Donnelly CJ, Zhang PW, Pham JT, et al. RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron* 2013, 80, 415-428.
37. Popescu IR, Nicaise C, Liu S, et al. Neural progenitors derived from human induced pluripotent stem cells survive and differentiate upon transplantation into a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Transl Med.* 2013, 2, 167-174.
38. Qian K, Huang H, Peterson A, et al. Sporadic ALS astrocytes induce neuronal degeneration in vivo. *Stem Cell Reports* 2017, 8, 843-855.
39. Ferraiuolo L, Meyer K, Sherwood TW, et al. Oligodendrocytes contribute to motor neuron death in ALS via SOD1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113, E6496-E6505.

### 3. ENVIRONMENTAL FACTORS AND EPIGENETICS

#### 3.1. MAIN ENVIRONMENTAL FACTORS ASSOCIATED WITH ALS AND THEIR MOLECULAR IMPACT ON THE MOTONEURON EPIGENOME

DR. MARÍA ANTONIA BARCELÓ / DR. PEDRO VIZÁN

ALS is a heterogeneous disease and its causes cannot be explained only from the genetic point of view. Genetic mutations do not entirely explain this heterogeneity because the same mutation can be associated with a large variability of ALS phenotypes<sup>1</sup>. At present, there are 29 known genetic risk factors causing or contributing to ALS, and maybe other unknown ones. The most prevalent mutated genes are SOD1, C9ORF72, TARDBP and FUS. However, the dominantly inherited familial ALS (fALS), for which heredity is mainly autosomal dominant, only accounts for 10% of all ALS patients, although in approximately 30% of familial ALS, the genetic aetiology is still unknown. Sporadic ALS (sALS), the most common form of ALS, has no apparent heritability despite the fact that the genetic aetiology is also not known. So far, the only recognized ALS risk factors are advanced age, being male and having a family history of ALS<sup>2</sup>.

The overall worldwide crude incidence of ALS is estimated as 1.75 per 100,000 persons/years of follow-up. With regards the prevalence, it has been estimated to be between 5 and 5.4 per 100,000 inhabitants. However, the geographical distribution of both ALS incidence and prevalence is very heterogeneous.

An important part of this heterogeneity can be attributed to the interrelationship between genetic and non-genetic factors. In fact, exposure to environmental factors in combination with an underlying genetic risk is the most likely explanation for how ALS develops<sup>3</sup>. As pointed out by Al-Chalabi and collaborators, ALS is a multi-step process where an underlying genetic defect can lead to several outcomes depending on subsequent environmental triggers<sup>4,5</sup>.

The non-genetic factors may include variables related to lifestyle (smoking, consumption of antioxidants, physical exercise and Body Mass Index), medical conditions (head injury, metabolic diseases, cancer and inflammatory diseases) and work and environmental related exposure ( $\beta$ -methylamino-L-alanine -BMAA-, viral infections, electromagnetic fields, heavy metal toxicity and exposure to pesticides and fertilizers)<sup>6,7,8,9,10,11,12</sup>. However, the systematic evidence of the association between environmental risk factors and the occurrence of ALS, besides being very limited, is inadequate or insufficient.

Comparatively, there is much more evidence on the association with ALS to the exposure to pesticides. In particular, those that have been found to have a greater number of statistically significant associations are precisely organochlorine pesticides.

In relation to exposure to metals, systematic evidence includes mostly lead, but also iron, selenium, manganese, mercury and aluminum.

The aetiology of ALS has been associated with exposure to magnetic fields in some occupational studies. However, the evidence at a general population level is very limited and inconsistent, either due to an exposure misclassification or because the association, if it exists, was in fact an indirect consequence of gene-environment interaction.

### 3. FACTORES AMBIENTALES Y EPIGENÉTICA

#### 3.1. PRINCIPALES FACTORES AMBIENTALES ASOCIADOS CON LA ELA Y SU IMPACTO MOLECULAR EN EL EPIGENOMA DE LAS MOTONEURONAS

DRA. MARÍA ANTONIA BARCELÓ / DR. PEDRO VIZÁN

La ELA es una enfermedad heterogénea cuyas causas no pueden ser explicadas solo desde un punto de vista genético, debido a que estas mutaciones pueden estar asociadas a fenotipos muy variables<sup>1</sup>. Actualmente, conocemos 29 factores de riesgo genéticos que causan o contribuyen a la ELA, y quizás haya otros desconocidos. Los genes mutados más prevalentes son SOD1, C9ORF72, TARDBP y FUS. Sin embargo, la ELA familiar (fALS), que muestra un patrón de herencia básicamente autosómico dominante, solo supone el 10% de todos los pacientes de ELA, y aproximadamente en el 30% de los casos de ELA familiar, la etiología genética continúa siendo desconocida. La ELA esporádica (sALS), la forma más común de ELA, no muestra aparentemente heredabilidad y sus causas genéticas también se desconocen en la mayoría de los casos. Hasta el momento, los únicos factores de riesgo reconocidos de la ELA son la edad avanzada, ser varón y tener un historial familiar de ELA<sup>2</sup>.

La incidencia bruta mundial de la ELA se estima en 1.75 por 100.000 personas/año de seguimiento. Con respecto a la prevalencia, ha sido estimada entre 5 y 5.4 por 100.000 habitantes. Sin embargo, la distribución geográfica tanto de la incidencia como de la prevalencia de ELA es muy heterogénea.

Una parte importante de esta heterogeneidad puede ser atribuida a la interrelación entre factores genéticos y no genéticos. De hecho, la exposición a factores ambientales en combinación con un riesgo genético subyacente es la explicación más probable sobre el desarrollo de la ELA<sup>3</sup>. Como ha sido apuntado por Al-Chalabi y colaboradores, la ELA es un proceso de múltiples pasos, donde un defecto genético subyacente puede dar como resultado distintos resultados en función de los desencadenantes ambientales posteriores<sup>4,5</sup>.

Los factores no genéticos pueden incluir variables relativas al estilo de vida (fumar, consumo de antioxidantes, ejercicio físico e índice de Masa Corporal), condiciones médicas (lesiones craneales, enfermedades metabólicas, cáncer y enfermedades inflamatorias) y exposición a agentes relacionados con el trabajo o el ambiente ( $\beta$ -metilamina-L-alanina -BMAA-, infecciones víricas, campos electromagnéticos, toxicidad de metales pesados y exposición a pesticidas y fertilizantes)<sup>6,7,8,9,10,11,12</sup>. Sin embargo, la evidencia sistemática de la asociación de factores de riesgo ambientales y la aparición de la ELA, además de ser muy limitada, es inadecuada o insuficiente.

Comparativamente, hay mucha más evidencia de la asociación de la ELA a la exposición de pesticidas. En particular, los que han mostrado tener una significación estadística mayor en esta asociación son concretamente los plaguicidas organoclorados.

En relación con la exposición a metales, la evidencia sistemática incluye principalmente el plomo, pero también el hierro, selenio, manganeso, mercurio y aluminio.

La etiología de la ELA se ha asociado a la exposición a campos magnéticos en algunos estudios de ocupaciones. Sin embargo, la evidencia a nivel de la población general es muy limitada e inconsistente, ya sea debido a una clasificación errónea de la exposición o porque la propia asociación, si existe, sea de hecho una consecuencia indirecta de la interacción gen-ambiente.

There is growing evidence that exposure to air pollution is related to neurodegenerative diseases, but little is known about the association with ALS.

There is also enough evidence (in relative terms) of the existence of spatial clusters of ALS, some of which are associated with environmental factors<sup>13</sup>. In a very recent paper, Povedano *et al.* found some spatial clusters of ALS. Our results suggest that these clusters could be related to some of the environmental variables, in particular agricultural chemicals. In addition, in high-risk clusters, besides corresponding to agricultural areas, key road infrastructures with a high density of traffic are also located<sup>14</sup>.

ALS also seems to disrupt spinal motor neuron maturation and aging pathways, supporting the idea that age-related neurodegeneration begins decades before clinical onset. Evidence points towards an increased risk of ALS due to exposure to a range of environmental toxicants, with the interaction between genetic susceptibility and environmental exposure probably responsible for most neurodegenerative diseases. The most likely explanation for the development of ALS is that ALS is the result of environmental exposures and time acting together.

The key underlying question is how these environmental factors affect the function of motor neurons in ALS, causing their degeneration. Cellular function is determined by the correct expression of genetic programs, or in other words: the group of active genes that are expressed. In recent years, intensive research efforts have been trying to determine the causative mechanism of the different mutations on the DNA sequence of genes in MNs degeneration. However, gene expression also relies in epigenetics changes, without affecting the DNA sequence. Epigenetics is the group of events that control gene activity without changes in the DNA sequence. Therefore, in addition to the genetic risk, which would be determined by the presence of the reported mutations, an epigenetic risk for ALS should be also considered. This epigenetic risk could be given when (1) the environmental factors directly alter the epigenetics of the individuals with whom they have contact, (2) there is an epigenetic predisposition in some people, so that the environmental factor in question has a differential impact on them.

Epigenetic alterations include the covalent modifications, including the addition of acetyl and methyl chemical groups on the chromatin, as well as RNA regulation. Chromatin is a complex macromolecule present in the nucleus composed by union the DNA, RNA and proteins. The basic unit of the chromatin is nucleosomes: DNA wrapped around a cluster of histone proteins. Covalent modifications in the histones or in the DNA molecules influence the expression of the genes encoded by this particular part of DNA.

ALS patients with mutations in the C9orf72 gene display an increased methylation of histones related with gene repression<sup>15</sup>. Worthy of note, haploinsufficiency has been proposed as one of the mechanisms of C9orf72-linked neurodegeneration. Moreover, recent reports suggest that a reduction in histone acetylation is a feature of neurodegenerative diseases. Accordingly, the expression of HDAC2 (an histone deacetylase enzyme) is elevated in post-mortem brain and spinal cords form ALS patients<sup>16</sup>. In this

Existe una evidencia creciente de que la exposición a la polución del aire está relacionada con las enfermedades neurodegenerativas, pero se conoce muy poco sobre su asociación con la ELA.

También hay suficiente evidencia (en términos relativos) de la existencia de *clusters* espaciales de ELA, algunos de los cuales están asociados a factores ambientales<sup>13</sup>. En un estudio muy reciente, Povedano et al. identificaron la existencia de algunos *clusters* espaciales de ELA. Estos resultados sugieren que estos *clusters* podrían estar relacionados con algunas de las variables ambientales, en particular con químicos agrícolas. Se suma a esto que los *clusters* de alto riesgo, además de corresponder a zonas agrícolas, presentan infraestructuras viales clave con alta densidad de tráfico<sup>14</sup>.

La ELA parece alterar también la maduración de la motoneurona espinal y las vías de envejecimiento, sugiriendo la idea de que la neurodegeneración ligada a la edad se inicia décadas antes de la aparición clínica de la enfermedad. Existe evidencia de un incremento en el riesgo de padecer ELA debido a la exposición a un abanico de tóxicos ambientales, junto a que la interacción entre susceptibilidad genética y exposición ambiental sean probablemente responsables de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas. La explicación más factible para el desarrollo de la ELA es que la ELA es el resultado conjunto de la exposición ambiental y el tiempo.

La pregunta clave es cómo estos factores ambientales afectan a la función de las motoneuronas en la ELA, causando su degeneración. La función celular viene determinada por la correcta expresión de programas genéticos o, en otras palabras: el grupo específico de genes que deben estar activos para que las células cumplan su función. En los últimos años, se han dedicado intensos esfuerzos de investigación en intentar determinar los mecanismos por los cuales las distintas mutaciones en la secuencia de DNA afectan a la expresión o funcionamiento de los genes asociados y provocan la degeneración de las motoneuronas. Sin embargo, la expresión de los genes también depende de los cambios epigenéticos, que no afectan a la secuencia de ADN. La epigenética es el conjunto de eventos que controla la actividad de los genes sin motivar cambios en la secuencia de DNA. Por lo tanto, además del riesgo genético, que puede ser determinado por la presencia de las mutaciones descritas, debemos considerar el riesgo epigenético asociado a la ELA. Este riesgo epigenético puede darse cuando (1) los factores ambientales alteran directamente la epigenética de los individuos con los que entran en contacto, (2) hay una predisposición epigenética en algunos sujetos, de forma que el factor ambiental en cuestión tiene un impacto diferenciado en ellos.

Las alteraciones epigenéticas comprenden modificaciones covalentes, incluyendo la adición de grupos acetilo y metilo en la cromatina, así como la regulación del RNA. La cromatina es una macromolécula compleja presente en el núcleo y compuesta por la unión de DNA, RNA y proteínas. La unidad básica de la cromatina son los nucleosomas: DNA alrededor de una agrupación de proteínas histonas. Las modificaciones covalentes en las histonas o en el propio DNA influyen en la expresión de los genes codificados por ese fragmento particular de DNA.

Los pacientes de ELA con mutaciones en el gen C9ORF72 muestran un incremento de la metilación de las histonas asociada al silenciamiento del gen<sup>15</sup>. Conviene reseñar que la haploinsuficiencia ha sido propuesta como uno de los mecanismos de la neurodegeneración ligada a C9ORF72. Por otro lado, estudios recientes sugieren que la reducción de la acetilación de las histonas es una característica de las enfermedades neurodegenerativas. De acuerdo con esto, la expresión de HDAC2 (una enzima que deacetila histonas) aparece elevada en muestras post-mortem de cerebros y médulas espinales de pacientes de ELA<sup>16</sup>. En este sentido, se ha propuesto la inhibición de varias

regard, inhibition of several HDACs have been proposed as a therapeutic approach for several neurodegenerative diseases<sup>17</sup>.

Regarding DNA methylation, analysis in brain and spinal cord, as well as in blood samples from affected individuals, has revealed several differences in methylation patterns in ALS, affecting the expression of genes such as SERPINA1<sup>18,19</sup> (see Dolinar, 2018 for an extensive review). On the other hand, hypermethylation of C9orf72 locus in carrier patients with high numbers of hexanucleotide repetitions has also been reported<sup>20</sup>, which may also contribute to the haploinsufficiency mechanism of action.

Finally, RNA editing or miRNAs expression are also epigenetic mechanisms to control gene expression. miRNAs are produced and processed in the nucleus and exert their function by regulating messenger RNA translation in the cytosol. Altered composition of miRNAs has been observed in many pathological situations, including neurodegenerative diseases, and interestingly have been linked with environmental factors<sup>21</sup>. Regarding ALS, several laboratories have studied the miRNA expression in different tissues and compared them with healthy individuals<sup>19,22</sup> (see Dolinar, 2018 for an extensive review). Moreover, mutations in RNA binding proteins such as TDP-43, which is part of miRNAs processing<sup>23</sup>, heighten the idea of altered miRNA expression in ALS.

The relationship between genetics, epigenetics and environment is crucial to effectively tackle ALS illness and its management. For example, as mentioned before, age is a recognized ALS risk factor, but genetic alteration linked with ALS are present for all patient lifespan. During aging, epigenetic alterations influence tissue functionality, and the lifestyle as well as the exposure to specific environmental factors may greatly influence the vulnerability required for the illness to clinically appear.

The following talks from Dr Ammar Al-Chalabi (King's College of London) and Dr Valentina Gallo (Queen Mary University of London) will enlighten us with the latest results and perspectives in exposome and epigenetic studies in ALS.

### 3.2. HOW CAN WE USE EPIGENETICS TO UNDERSTAND ALS?

/ DR. AMMAR AL-CHALABI

#### What is epigenetics?

DNA is the molecule in each of our cells encoding the information required to make proteins. Every schoolchild is familiar with the genetic code and that the DNA sequence is inherited from the mother and father. In fact, only about 1% of the genome encodes proteins. Much of the rest has functions that are only now becoming apparent, and we are only recently beginning to understand how these functions are encoded. A mystery has always been that all genes are present in every cell, but each cell is different. Clearly then something must be regulating the expression of different genes at different times. This developmental control is partly through DNA sequences that are transcribed into short RNA sequences known as microRNA, which act to regulate gene expression<sup>24,25</sup>. Gene expression is also controlled through methylation of cytosine bases (C in the genetic code), and acetylation of histones – the proteins that help to pack the very long DNA strands into the cell nucleus. Methylation and deacetylation result in gene silencing,

HDACs como una aproximación terapéutica para distintas enfermedades neurodegenerativas<sup>17</sup>.

En relación a la metilación del DNA, análisis de cerebros, médulas espinales, así como muestras de sangre de individuos afectados, ha revelado distintas diferencias en los patrones de metilación en la ELA, que afectan a la expresión de genes como *SERPIN-A1*<sup>18,19</sup> (ver Dolinar, 2018 para una revisión más extensa). Por otra parte, se ha descrito la hipermetilación del locus C9ORF72 en pacientes portadores con elevado número de repeticiones de hexanucleótidos<sup>20</sup>, lo que puede también contribuir a la haploinsuficiencia.

Finalmente, la edición de RNA o la expresión miRNAs son también mecanismos epigenéticos para controlar la expresión génica. Los miRNAs se producen y procesan en el núcleo y ejercen su función regulando el transporte de RNA mensajero al citosol. La alteración en la composición de miRNAs ha sido observada en numerosas situaciones patológicas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, y resulta interesante que se ha asociado a factores ambientales<sup>21</sup>. Con relación a la ELA, varios laboratorios han estudiado la expresión del miRNA en distintos tejidos comparándolos con los de sujetos sanos<sup>19,22</sup> (ver Dolinar, 2018 para una revisión más extensa). Es más, mutaciones en las proteínas de ensamblaje como TDP-43, que forma parte del procesado de los miRNAs<sup>23</sup>, fortalecen la idea de una expresión alterada de miRNA en la ELA.

La relación entre genética, epigenética y ambiente es crucial para un abordaje efectivo de la ELA y su manejo. Por ejemplo, como hemos mencionado ya, la edad se reconoce como factor de riesgo en la ELA, pero las alteraciones genéticas asociadas con la ELA están presentes en el paciente durante toda su vida. Durante el envejecimiento, las alteraciones epigenéticas que influyen en la funcionalidad de los tejidos y el estilo de vida, así como la exposición a factores ambientales específicos, pueden influir enormemente en la vulnerabilidad necesaria para que la enfermedad se manifieste clínicamente.

Las siguientes contribuciones de los doctores Al-Chalabi (King's College of London) y Valentina Gallo (Queen Mary University of London) nos iluminarán acerca de los últimos resultados y perspectivas en epigenética de la ELA y el exposoma.

### 3.2. ¿CÓMO PODEMOS EMPLEAR LA EPIGENÉTICA PARA ENTENDER LA ELA?

/ DR. AMMAR AL-CHALABI

#### ¿Qué es la Epigenética?

El DNA es la molécula que en cada una de nuestras células codifica la información requerida para producir proteínas. Todos los niños en edad escolar están familiarizados con el código genético y con que la secuencia de DNA se hereda de madres y padres a hijos. De hecho, sólo aproximadamente el 1% del genoma codifica proteínas. Buena parte del resto tiene funciones que sólo ahora se están conociendo, y sólo recientemente empezamos a entender cómo estas funciones están codificadas. El misterio es que si todos los genes están presentes en cada célula, cómo estas son distintas entre sí. Obviamente, algo debe estar regulando la expresión de distintos genes en distintos momentos. Este control del desarrollo se lleva a cabo parcialmente a través de secuencias de DNA que se transcriben en pequeñas secuencias de RNA conocidas como microRNA, que actúan regulando la expresión génica<sup>24,25</sup>. La expresión de los genes está controlada también a través de la metilación de bases de citosina (C en código genético) y la acetilación de histonas — las proteínas que ayudan a empaquetar las largas hebras de DNA en el núcleo celular. La metilación y la desacetilación producen el silenciamiento de los genes,

a process also known as imprinting<sup>26</sup>. If the cytosine is not methylated and the histone is acetylated, the DNA strand is in an open state and can be transcribed. These methylation and acetylation changes are marks on the DNA sequence, but do not change the sequence itself. Nevertheless, they can be inherited, and epigenetics is the study of heritable DNA changes that do not change the sequence itself.

The epigenetic control of gene expression is important in development, because the timing and extent of gene expression is fundamental to the differentiation of cells. It is also now clear that epigenetic changes can occur in response to environmental exposures, and these changes can in turn be inherited<sup>27</sup>. This direct inheritance of the response to an environmental factor appears to go against the central dogma of evolutionary theory, namely that natural selection acts only on genetic variation in the population through the selection of traits as fit or unfit for an environment. Nevertheless, environmental exposures such as smoking leave a definite epigenetic signature in the genome<sup>28</sup>. Because aging is programmed at a cellular level, it is also possible to estimate age from an epigenetic profile<sup>29</sup>.

### **Epigenetics in ALS**

The study of epigenetics is a new field in disease research. Tools for whole genome assessment of methylation in large numbers of people are only now becoming readily available and easily affordable.

In ALS, twin studies show about 60% of risk is heritable, and that conversely, about 40% is environmental<sup>30</sup>. Epigenetic risk straddles both aspects. Twin studies used to estimate heritability, would show inherited epigenetic changes in the heritable component, because identical twins would share marks more frequently than non-identical twins. On the other hand, environmental exposures changing the epigenetic marks in life would show in the non-heritable, environmental component.

There are two strong, well-recognized risk factors for ALS: a family history of ALS and increasing age. A family history is present in between 5% and 20% of people<sup>31</sup>, depending on the definition used<sup>32</sup> and the population studied, and it is generally assumed that a family history indicates a genetic predisposition to disease, while the absence of such a history implies an environmental basis<sup>33</sup>. However, despite being born with a large effect Mendelian disease gene, people with an inherited form of ALS still only develop symptoms later in life. Regardless of family history, the risk of ALS rises steadily, so that the cumulative lifetime risk reaches about 1 in 300 by age 80<sup>34</sup>. What can we deduce about the mechanism of ALS from our observation of the increasing risk with age?

### **The multistep model of ALS and epigenetics**

Work in the statistical modelling of cancer incidence in the 1950s showed that a power law would underlie the relationship between age and incidence if cancer was a multistep process<sup>35</sup>. In other words, if several molecular “hits” are required before a cell undergoes malignant transformation, the risk would increase with age exponentially. We now know that in at least some cancers, a multistep process like this is the mechanism

un proceso también conocido como sellado<sup>26</sup>. Si la citosina no está metilada y la histona está acetilada, la cadena de DNA se encuentra en un estado abierto y puede ser transcrita. Estos cambios en la metilación y la acetilación son marcas sobre la secuencia de DNA, pero no cambian la secuencia en sí misma. Sin embargo, pueden ser heredados, y la Epigenética es el estudio de estos cambios en el DNA heredables pero que no cambian la propia secuencia.

El control epigenético de la expresión génica es importante durante el desarrollo, porque el momento y la duración de la expresión de los genes es fundamental para la diferenciación celular. Ahora conocemos que los cambios epigenéticos pueden ocurrir en respuesta a la exposición al ambiente, y estos cambios pueden volverse heredables<sup>26</sup>. Esta herencia directa de la respuesta a un factor ambiental parece contradecir el dogma central de la teoría de la evolución, a saber, que la selección natural actúa sólo sobre la variación genética de la población a través de la selección de rasgos en función de su aptitud o falta de ella en un ambiente dado. Sin embargo, la exposición al ambiente, como el tabaco, deja una marca epigenética definitiva en el genoma<sup>28</sup>. Debido a que el envejecimiento está programado a nivel celular, también es posible estimar la edad a partir de un perfil epigenético<sup>29</sup>.

### **Epigenética en ELA**

El estudio de la epigenética es un nuevo campo en la investigación de la enfermedad. Sólo recientemente, las herramientas para analizar la metilación en todo el genoma en grandes muestras de pacientes están disponibles y son accesibles.

En ELA, los estudios en gemelos muestran que aproximadamente un 60% del riesgo de padecer la enfermedad se debe a la herencia, y a la inversa, aproximadamente un 40% es debido al ambiente<sup>30</sup>. El riesgo epigenético está a caballo de ambos aspectos. Los estudios de gemelos empleados para estimar la heredabilidad, mostrarían cambios epigenéticos hereditarios de esta componente, ya que los gemelos idénticos compartirían marcas más frecuentemente que gemelos no idénticos. Por otra parte, la exposición al ambiente produce cambios en las marcas epigenéticas a lo largo de la vida que se mostrarían en la componente no hereditaria, ambiental.

Hay dos factores de riesgo ampliamente reconocidos en ELA: un historial familiar de ELA y la edad avanzada. La historia familiar está presente en entre un 5% y un 20% de las personas<sup>31</sup>, según la descripción empleada<sup>32</sup> y la población de estudio, y se asume generalmente que la historia familiar indica una predisposición genética a la enfermedad, mientras que la ausencia de esa historia implica una base ambiental<sup>33</sup>. Sin embargo, a pesar de haber nacido con un gen de la enfermedad con gran efecto mendeliano, hay individuos con formas de ELA hereditaria que solo desarrollan los síntomas en un momento tardío de sus vidas. Independientemente de los antecedentes familiares, el riesgo de padecer ELA aumenta de forma constante con el tiempo, de forma que el efecto acumulativo de la edad alcanza aproximadamente un 1 sobre 300 a los 80 años de edad<sup>34</sup>. ¿Qué podemos deducir sobre los mecanismos de la ELA de nuestra observación sobre el riesgo creciente con la edad?

### **El modelo multi-fase en ELA y la epigenética**

El trabajo en el modelado estadístico de la incidencia de cáncer en los años cincuenta mostró una regla potencial en la relación entre edad e incidencia si el cáncer fuera un proceso multi-fase (o multi-paso)<sup>35</sup>. En otras palabras, si para que una célula se transforme en maligna se requirieran varios eventos moleculares previos, el riesgo se incrementaría exponencialmente con la edad. Ahora sabemos que al menos en algunos cán-

of disease causation, with inherited changes followed by somatic mutation, until a final step is activated and cancer begins. One consequence of this model is that a plot of the log of incidence against the log of age would be a straight line, and the slope would be one less than the number of steps required for disease to commence. We have previously applied the multistep model to ALS and shown that in five different population registers in Europe, ALS incidence is consistent with a multistep process requiring six steps<sup>5</sup>.

A multistep process underlying ALS risk explains several otherwise mysterious aspects. For example, the increasing risk with age is a result of the need to accumulate all the steps. The reduced gene penetrance observed for some disease genes is a result of people carrying a risk gene not otherwise being exposed to the necessary remaining steps. A conclusion would also be that people carrying a large effect risk gene would be expected to require fewer steps, and this is in fact the case. Environmental causes would be difficult to find because several different exposures can result in the same molecular step (for example smoking and radiation exposure both increase mutagenesis). A single gene variant could result in ALS or frontotemporal dementia or both, because it depends what other steps have occurred.

This multistep disease risk can be modelled on an individual basis using a concept called the liability threshold model, widely used in genetics<sup>36,37</sup>. In the liability threshold model, there is a normal distribution of the liability to disease in the general population, but only those people accumulating sufficient liability express the condition. In ALS, this has been explored through the gene-environment-time model of disease risk<sup>4</sup>. A conclusion of these models is that those with a large effect Mendelian gene mutation would have some of the steps accounted for and therefore be expected to have fewer remaining steps to be triggered by environmental or epigenetic effects; as a result, we should look for environmental and epigenetic risk factors not in those with apparently sporadic ALS, but in those with familial ALS<sup>38</sup>.

### Perspectives of epigenetics in ALS

There are three ways that we can currently explore the relationship between epigenetic marks and ALS risk or phenotype. First, we can use epigenetics as a way to capture environmental data that would otherwise be difficult to ascertain with certainty, and in larger numbers than would usually be possible. This is because epigenetic findings can be assayed from DNA and RNA extracted in genetic studies, and does not need a questionnaire based assessment with inherent problems such as recall bias. For example, we can assess the risk of smoking on ALS because the smoking methylation signature is well characterized. Second, we can look for signals such as those suggesting accelerated aging, because the epigenetic clock is understood. Since age is a strong risk factor for ALS, a greater cellular age than biological age might be expected for people with ALS. Third we can perform a hypothesis-free, epigenome-wide association study at hundreds of thousands of epigenetic loci in a so-called EWAS. All these approaches are currently underway and will illuminate developmental, aging, and environmental risk and modifier factors for ALS.

ceres, un proceso multi-paso como este es el mecanismo causante de la enfermedad, con cambios hereditarios seguidos de mutaciones somáticas, hasta que un paso final es activado y el cáncer comienza. Una consecuencia de este modelo es que la representación gráfica del registro de la incidencia frente a la edad sería una línea recta, y la pendiente sería uno menos que el número de pasos requeridos para que la enfermedad se inicie. Aplicamos previamente este modelo multi-paso a la ELA y mostramos que, en cinco registros de población diferentes en Europa, la incidencia de ELA es consistente con un proceso multi-fase de seis pasos<sup>5</sup>.

Un proceso multi-paso subyacente al riesgo de padecer ELA explicaría muchos aspectos que de otra manera seguirían sin respuesta. Por ejemplo, el riesgo incremental con la edad, resultado de la necesidad de acumular todos estos pasos. La baja penetrancia génica observada en algunos genes sería un resultado de portadores de genes de riesgo sin exposición a los demás pasos necesarios. Una posible conclusión sería también que los portadores de genes de riesgo de gran efecto requerirían un número menor de pasos, y de hecho este es el caso. Las causas ambientales serían difíciles de encontrar, ya que varias exposiciones diferentes podrían dar lugar a un mismo paso molecular (por ejemplo, fumar y la exposición a radiación, ambos incrementan la mutagénesis). Una única variante génica podría dar lugar a la ELA o demencia temporal o ambas, en función del resto de pasos que hubieran ocurrido.

Este riesgo de enfermedad multi-paso puede modelarse de forma individual empleando el concepto *liability threshold model* (o modelo de umbral de riesgo), ampliamente empleado en genética<sup>36,37</sup>. En este modelo, hay una distribución normal de la contribución a la enfermedad en la población general, pero solo aquellos que acumulan una contribución suficiente expresan la condición. En ELA, esto ha sido explorado mediante el modelo de riesgo de enfermedad genes-ambiente-tiempo<sup>4</sup>. Una conclusión de estos modelos es que aquellos con mutaciones génicas mendelianas de gran efecto podrían tener algunos pasos ya explicados, y por tanto sería de esperar que fueran necesarios menos efectos del ambiente o epigenéticos para desencadenar la enfermedad; como resultado de ello, deberemos buscar factores de riesgo ambientales y epigenéticos en pacientes con ELA familiar, mejor que en pacientes de ELA esporádica ALS<sup>38</sup>.

### Estudio de la epigenética en la ELA

Hay tres modos de que podamos explorar actualmente la relación entre marcas epigenéticas y riesgo de padecer ELA o fenotipo. En primer lugar, podemos emplear la epigenética como un modo de capturar datos ambientales que de otra forma sería difícil medir con certidumbre y en grupos de un tamaño mayor del posible habitualmente. Esto se debe a que las manifestaciones epigenéticas pueden ser medidas en DNA y RNA extraídos en los estudios genéticos, y no requieren una evaluación basada en cuestionarios, con sus problemas inherentes tales como el sesgo de recuerdo. Por ejemplo, podemos evaluar el riesgo del tabaco en la ELA a través de la firma de metilación característica de este. En segundo lugar, podemos buscar señales como aquellas que sugieren un envejecimiento acelerado, puesto que conocemos el reloj epigenético. Puesto que la edad es un factor de riesgo alto de la ELA, cabría esperar en los pacientes de ELA una edad celular mayor que la biológica. En tercer lugar, podemos llevar a cabo estudios de asociación del epigenoma completo sin hipótesis en cientos de miles de loci, el denominado EWAS. Todas estas aproximaciones están actualmente en curso y arrojarán luz acerca de los riesgos en el desarrollo, el envejecimiento y el ambiente y sobre los factores modificadores de la ELA.

As the field of epigenetics matures, assays improve, and our analytic methods are perfected, we will unravel the relationship between gene regulation and ALS.

### 3.3. ENVIRONMENTAL FACTORS THAT MODULATES ALS RISK

/ DR. VALENTINA GALLO

Surprisingly very few environmental risk factors have been established to increase the risk of ALS: for example, cigarette smoking. For others, such as anthropometric measurements and physical activity, the evidence is not consistent, the interpretation of findings depends on study design and it is not always straightforward. Other rarer exposures, or exposures with smaller size effects (such as heavy metals or pesticides) have been suggested to play a role in ALS aetiology, but they are more difficult to explore given that they are rare or exposure is at very low levels. The concept of meet-in-the-middle, whereby the use of biomarkers in different study designs would help the establishment of an association between rare exposures and rare outcomes, is ideally placed in this context. The newest exposomic techniques would allow for an agnostic bottom-up approach in the analysis of environmental risk factors for ALS.

#### Epidemiological evidence

Surprisingly very few environmental risk factors have been established to increase the risk of ALS. Cigarette smoking has been associated to an increased risk of ALS<sup>39</sup>, but this might be stronger in women than men, and the association overall is thought to be weak, increasing the risk of ALS by 30% comparing ever vs. never smokers<sup>40,41</sup>.

The anthropometric and physical characteristics before disease onset seem to have a role in modulating ALS risk: having a low body mass index is associated with an increased risk<sup>42,43</sup>, and this seems not to be due to reverse causality. Participating in extenuating physical activity or organized competitive sport at young ages is also associated to an increased risk of ALS<sup>44,45,46,47</sup>. This could reflect either a genetic predisposition to a leaner and athletic body, or the two factors could be independent and the increased risk in organized sport could be at least partially explained by an increased risk of traumatic head injury. Head injury has been shown as positively associated with ALS risk<sup>40</sup>, although a recent review suggests that this is mainly driven by reverse causality<sup>48</sup>. On the other hand, recreational physical activity was found inversely associated with ALS risk<sup>40,49</sup>.

Heavy metals (particularly lead and mercury) and pesticides have been associated with an increased risk of ALS in a number of studies<sup>40</sup>. However, these studies often use broad proxy to measure exposure such as living in a rural environment or next to agricultural fields and the high heterogeneity across studies usually prevent firm conclusions from being drawn<sup>40</sup>.

#### Meet in the middle and exposomics

Studying risk factors in the aetiology of rare diseases is a particularly challenging task for epidemiologists, and the challenge is greater when the risk factors at stake are rare as well (as in the case of heavy metals and pesticides in relation to ALS). Few extremely

A medida que el campo de la epigenética madure, los ensayos mejoren y nuestros métodos analíticos se perfeccionen, seremos capaces de desentrañar la relación entre regulación genética y ELA.

### 3.3. FACTORES AMBIENTALES QUE MODULAN EL RIESGO DE ELA

/ DRA. VALENTINA GALLO

Sorprendentemente, muy pocos factores ambientales han sido asociados con un mayor riesgo de padecer ELA: por ejemplo, ser fumador. En otros factores, como, por ejemplo, las medidas antropométricas y la actividad física, la evidencia no es consistente. La interpretación de los resultados depende del diseño del estudio y no es siempre sencilla. Se ha sugerido que otros factores con menor exposición y efectos reducidos (como los metales pesados o los pesticidas) pueden jugar un papel en la etiología de la ELA, pero son más complejos de explorar al tratarse precisamente de exposiciones poco frecuentes o a muy bajos niveles. El concepto "meet-in-the-middle" (encontrarse a medio camino), en el que se utilizan biomarcadores para evaluar la asociación entre exposiciones raras y resultados poco frecuentes, se posiciona idealmente en este contexto. Las técnicas más modernas de exposómica podrían permitirnos llevar a cabo una aproximación de abajo a arriba (bottom-up) en el análisis de los factores ambientales de la ELA.

#### Evidencia epidemiológica

Ser fumador aumenta el riesgo de ocurrencia de la ELA<sup>39</sup>. Los sujetos fumadores tienen un 30% más de riesgo de sufrir ELA que aquellos que nunca han fumado<sup>40,41</sup>. Sin embargo, el riesgo conjunto es pequeño y mayor en mujeres que en hombres<sup>40,41</sup>.

Las características antropométricas y físicas antes del inicio de la enfermedad parecen tener un rol en la modulación del riesgo de ELA. Tener un índice de masa corporal bajo se asocia a un riesgo mayor<sup>42,43</sup>, y esta asociación no parece ser debida a la causalidad inversa. Participar en actividades físicas extenuantes o en competiciones deportivas organizadas a edades tempranas también se ha asociado a un mayor riesgo de ELA<sup>44,45,46,47</sup>. Sin embargo, podría ocurrir que los individuos que padecen ELA pudieran tener una predisposición genética a la delgadez y/o a un cuerpo atlético. Por otra parte, el mayor riesgo de participar en competiciones deportivas organizadas podría ser explicado, al menos parcialmente, por un mayor riesgo de padecer una lesión craneal traumática. Las lesiones craneales se han asociado directamente con un mayor riesgo de padecer ELA<sup>40</sup>. Aunque una revisión reciente sugiere que esta asociación podría ser explicada por causalidad inversa<sup>48</sup>. Por otra parte, la actividad física recreativa ha sido identificada como un factor protector de padecer ELA<sup>40,49</sup>.

Los metales pesados (particularmente el plomo y el mercurio) y los pesticidas han sido asociados con un riesgo mayor de ocurrencia de la ELA en distintos estudios<sup>40</sup>. Sin embargo, estos estudios emplean habitualmente medidas secundarias de la exposición tales como vivir en un ambiente rural o cerca de terrenos agrícolas y presentan una gran heterogeneidad, lo que impide que se puedan extraer resultados concluyentes<sup>39</sup> (Wang, et al., 2017).

#### 'Meet in the middle' y la exposómica

Estudiar los factores de riesgo en la etiología de las enfermedades raras es una tarea particularmente difícil para los epidemiólogos, y el reto es mayor cuando los factores de riesgo en juego son a su vez poco frecuentes (como los metales pesados y los pesticidas,

large population-based cohort studies gave rise to enough ALS cases during follow up to allow the recall-bias free study or environmental factors for the disease. However, not all potential risk factor information was collected at baseline, therefore the analysis has to be limited to the available information.

One of the approaches used to address the challenge of studying the association between rare exposures and rare outcomes is the meet-in-the-middle approach using biomarkers<sup>50</sup>. Biomarkers may provide valuable scientific tools due to their ability to inform on biological mechanisms through the examination of early, intermediate and late molecular and cellular events and biological effects. Moreover, a biomarker may capture several external exposure variables in a single biologically relevant quantity, provide quantitative measurements, increase statistical power and be used as an efficient and informative intermediate outcome. Finally, biomarkers can be used to identify susceptible individuals and to improve diagnosis and early detection of disease<sup>51</sup>.

According to the meet-in-the-middle approach, biomarkers can be used as intermediate variables to assess the association between rare exposure and rare outcomes. If a particular biomarker is shown to be associated with a rare exposure (e.g. chromosomal aberrations as results of benzene exposure) in cross-sectional and case-control study; and the same biomarker is in turn associated to a rare outcome in nested case-control studies (e.g. chromosomal aberration and leukemia), it is possible to infer on the association between the rare exposure and the rare outcome using multiple populations and study designs<sup>50</sup>.

The exposome concept refers to the totality of environmental exposures from conception onwards and is a novel approach to studying the role of the environment in human disease. This includes also the determination of the associations between exposures, intermediate markers and disease. Building on this, the meet-in-the-middle approach includes a construction of a multilayer causal framework<sup>52</sup>. Its implementation aims to address the challenge of identifying causal relationships that link exposures and disease outcomes. Applied to ALS, this approach would allow the exploration of causality of the association with a number of rare exposures.

### 3.4. THE CHALLENGE OF ASSOCIATING ENVIRONMENTAL EFFECTS ASSOCIATED WITH THE APPEARANCE OF ALS AT AN EPIGENETIC LEVEL

DR. MARÍA ANTONIA BARCELÓ / DR. PEDRO VIZÁN

Epigenetics have emerged as a prominent field of study of several neurodegenerative diseases<sup>53</sup>. However, in ALS its study is still in its infancy. Epigenetic alterations have very interesting characteristics: 1) they respond to external cues and 2) they are reversible. In this regard, linking environmental factors with known epigenetic modifications would be of great interest. However, this is a very difficult challenge since, as we have discussed, very few environmental risk factors have been unambiguously established. On the one hand, increased efforts in the epidemiology are needed to reveal characteristic exposomes linked with ALS onset. On the other, epigenetic characterization using the disease models should be tackled from a systematic perspective in order to find spe-

en el caso de la ELA). Unos pocos estudios de cohortes basados en poblaciones grandes han logrado seguir en el tiempo un número suficiente de casos de ELA para permitir el estudio de factores ambientales de la enfermedad. Sin embargo, no toda la información sobre factores de riesgo potenciales se recopiló al inicio del estudio, lo que hace que el análisis haya tenido que limitarse al estudio de la información disponible.

Una de las aproximaciones utilizadas para abordar el desafío de estudiar la asociación entre las exposiciones poco frecuentes y los resultados raros es la aproximación "meet-in-the-middle", en la que se utilizan biomarcadores<sup>50</sup>. Los biomarcadores pueden proporcionar herramientas científicas valiosas debido a su capacidad de informar sobre los mecanismos biológicos a través del examen de sucesos y efectos biológicos tempranos, intermedios y tardíos. Además, un biomarcador puede capturar distintas variables de exposición externa en una sola cantidad biológicamente relevante, proporcionar mediciones cuantitativas, aumentar el poder estadístico y mejorar el diagnóstico y la detección temprana de la enfermedad<sup>51</sup>.

De acuerdo a la aproximación "meet-in-the-middle", los biomarcadores pueden ser empleados como variables intermedias para analizar la asociación entre exposiciones poco frecuentes y resultados raros. Si un biomarcador en particular muestra una asociación con una exposición poco frecuente (por ejemplo, aberraciones cromosómicas como resultado de la exposición al benceno) en estudios transversales y en estudios caso-control, y el mismo biomarcador está asociado a su vez a un resultado raro en estudios de casos y controles anidados (por ejemplo, aberraciones cromosómicas y leucemia), es posible inferir la asociación entre la exposición poco frecuente y el resultado raro empleando múltiples diseños de estudios y poblaciones<sup>50</sup>.

El concepto de exposoma se refiere a la totalidad de exposiciones ambientales desde la concepción, y es una nueva aproximación al estudio del papel que juega el medio ambiente en las enfermedades humanas. Esto incluye también la determinación de las asociaciones entre exposiciones, marcadores intermedios y enfermedad. Basándose en esto, la aproximación 'meet-in-the-middle' incluye la construcción de un marco causal multicapa<sup>52</sup>. Su implementación tiene por objetivo abordar el reto de identificar relaciones causales que vinculen las exposiciones con la enfermedad. Aplicado a la ELA, esta aproximación podría permitir explorar la causalidad de la asociación con varias exposiciones poco frecuentes.

### 3.4. EL RETO DE LA ASOCIACIÓN DE EFECTOS AMBIENTALES A LA APARICIÓN DE LA ELA A NIVEL EPIDEMIOLÓGICO

DRA. MARÍA ANTONIA BARCELÓ / DR. PEDRO VIZÁN

La Epigenética ha emergido como un campo de estudio prominente en distintas enfermedades neurodegenerativas<sup>53</sup>. Sin embargo, en la ELA aún nos encontramos en la primera etapa de su estudio. Las alteraciones epigenéticas tienen varias características interesantes: 1) responden a señales externas y 2) son reversibles. En este sentido, la asociación de factores ambientales a modificaciones epigenéticas sería de gran interés. Sin embargo, es un reto difícil debido a que, como ya hemos discutido, han sido muy pocos los factores de riesgo ambientales establecidos inequívocamente. Por otra parte, se necesita incrementar los esfuerzos en la epidemiología para revelar exposomas característicos ligados al inicio de la ELA. Además, la caracterización epigenética empleando los modelos de enfermedad debe abordarse desde una perspectiva sistemática, para encontrar alteraciones epigenéticas específicas de la degeneración de la

cific epigenetic alterations associated with motor neuron degeneration in ALS. These alterations should be corroborated in clinical samples. Then, both fields will need to converge to fully understand how gene regulation beyond known mutations is causing the illness. Worthy of note, due to its reversibility, epigenetic factors or even the associated epigenetic modifications, may represent very good targets to explore therapeutic interventions.

motoneurona en la ELA. Estas alteraciones deberán ser corroboradas en muestras clínicas. Por tanto, ambos campos necesitan converger para entender plenamente cómo la regulación genética, más allá de las mutaciones conocidas, está causando la enfermedad. Destacamos que, debido a su reversibilidad, los factores epigenéticos e incluso las modificaciones epigenéticas asociadas, pueden ser muy buenas dianas para explorar nuevas intervenciones terapéuticas.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS / BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Sher RB. (2017). The interaction of genetics and environmental toxicants in amyotrophic lateral sclerosis: results from animal models. *Neural Regen Res.*, 12(6):902-990.
2. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E. (2016). Environmental risk factors and amyotrophic lateral sclerosis: an umbrella review and critical assessment of current evidence from systematic reviews and meta-analyses of observational studies. *Neuroepidemiology*, 46(2):96-105.
3. Callaghan B, Feldman D, Gruis K, Feldman E. (2011). The association of exposure to lead, mercury and selenium and the development of amyotrophic lateral sclerosis and the epigenetic implications. *Neurodegener Dis.*, 8(1-2):1-8.
4. Al-Chalabi A, Hardiman O. (2013). The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol.*, 9(11):617-628.
5. Al-Chalabi A, Calvo A, Chio A, Colville S, Ellis CM, Hardiman O, Howard 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(11):1108-1113.
6. Trojsi F, Monsurro MR, Tedeschi G. (2013). Exposure to environmental toxicants and pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: state of the art and research perspectives. *Int J Mol Sci.*, 14(8):15286-15311.
7. Modgil S, Lahiri DK, Sharma VL, Anand A. (2014). Role of early life exposure and environment on neurodegeneration: implications on brain disorders. *Transl Neurodegener*, 29:3-9.
8. Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Epidemiol.*, 7:181-193.
9. Oskarsson B, Horton K, Mitsumoto H. (2015). Potential Environmental Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin.*, 33(4):877-888.
10. Mostafalou S, Abdollahi M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol.*, 91(2):549-599.
11. Maya S, Prakash T, Madhu KD, Goli D. (2016) Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. *Biomed Pharmacother.*, 83:746-754.
12. Kang H, Cha ES, Choi GJ, Lee WJ. (2014). Amyotrophic lateral sclerosis and agricultural environments: A systematic review. *J Korean Med Sci*, 29:1610-1617.
13. Caller TA, Field NC, Chipman JW, Shi X, Harris BT, Stommel EW. (2012). Spatial clustering of amyotrophic lateral sclerosis and the potential role of BMAA. *Amyotroph Lateral Scler.*, 13(1):25-32.
14. Povedano M, Saez M, Martínez-Matos JA, Barceló MA. (2018). Spatial assessment of the association between long-term exposure to environmental factors and the occurrence of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Catalonia, Spain. A population-based nested case-control study. *Neuroepidemiology*, 51(1-2):33-49.
15. Belzil VV, Bauer PO, Prudencio M, Gendron TF, Stetler CT, Yan IK, Pregent L, Daugherty L, Baker MC, Rademakers R, Boylan K, Patel TC, Dickson DW, Petrucelli L. Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood. *Acta Neuropathol.* 2013 Dec;126(6):895-905.
16. Janssen C, Schmalbach S, Boeselt S, Sarlette A, Dengler R, Petri S. (2010). Differential histone deacetylase mRNA expression patterns in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 69(6), 573-581.

17. Didonna A, Opal P. (2015). The promise and perils of HDAC inhibitors in neurodegeneration. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(1), 79–101.
18. Ebbert MTW, Ross CA, Pregent LJ, Lank RJ, Zhang C, Katzman RB, et al. (2017). Conserved DNA methylation combined with differential frontal cortex and cerebellar expression distinguishes C9orf72-associated and sporadic ALS and implicates SERPINA1 in disease. *Acta Neuropathologica*, 134(5), 715–728.
19. Dolinar A, Ravnik-Glavač M, Glavač D. (2018). Epigenetic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis: a short review. *Mechanisms of Ageing and Development*.
20. Xi Z, Zinman L, Moreno D, Schymick J, Liang Y, Sato C, et al. (2013). Hypermethylation of the CpG island near the G4C2 repeat in ALS with a C9orf72 expansion. *American Journal of Human Genetics*, 92(6), 981–989.
21. Ferrante M, Conti GO (2017). Environment and Neurodegenerative Diseases: An Update on miRNA Role. *Microrna*, 6(3):157–165.
22. Paez-Colasante X, Figueroa-Romero C, Sakowski SA, Goutman SA, Feldman EL. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and therapeutics in the epigenomic era. *Nature Reviews Neurology*, 11(5), 266–279.
23. Di Carlo V, Grossi E, Laneve P, Morlando M, Dini Modigliani S, Ballarino M, et al. (2013). TDP-43 regulates the microprocessor complex activity during in vitro neuronal differentiation. *Molecular Neurobiology*, 48(3), 952–963.
24. Fischer SE. RNA Interference and MicroRNA-Mediated Silencing. *Curr Protoc Mol Biol*. 2015;112:26 1 1-5.
25. Huang B, Jiang C, Zhang R. Epigenetics: the language of the cell? *Epigenomics*. 2014;6(1):73–88.
26. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23–38.
27. Nilsson EE, Sadler-Riggleman I, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environ Epigenet*. 2018;4(2):dvy016.
28. Tsaprouni LG, Yang TP, Bell J, Dick KJ, Kanoni S, Nisbet J, Vinuela A, Grundberg E, Nelson CP, Meduri E, Buil A, Cambien F, Hengstenberg C, Erdmann J, Schunkert H, Goodall AH, Ouwehand WH, Dermitzakis E, Spector TD, Samani NJ, Deloukas P. Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics*. 2014;9(10):1382–96.
29. Zubakov D, Liu F, Kokmeijer I, Choi Y, van Meurs JBJ, van IWFJ, Uitterlinden AG, Hofman A, Broer L, van Duijn CM, Lewin J, Kayser M. Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Sci Int Genet*. 2016;24:33–43.
30. Al-Chalabi A, Fang F, Hanby MF, Leigh PN, Shaw CE, Ye W, Rijsdijk F. An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(12):1324–6.
30. Byrne S, Walsh C, Lynch C, Bede P, Elamin M, Kenna K, McLaughlin R, Hardiman O. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(6):623–7.
31. Byrne S, Walsh C, Lynch C, Bede P, Elamin M, Kenna K, McLaughlin R, Hardiman O. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(6):623–7.
32. Byrne S, Elamin M, Bede P, Hardiman O. Absence of consensus in diagnostic criteria for familial neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(4):365–7.
33. Al-Chalabi A. Perspective: Don't keep it in the family. *Nature*. 2017;550(7676):S112.

34. Johnston CA, Stanton BR, Turner MR, Gray R, Blunt AH, Butt D, Ampong MA, Shaw CE, Leigh PN, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: a population based study of inner city London. *J Neurol*. 2006;253(12):1642-3.
35. Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer*. 1954;8(1):1-12.
36. Yang J, Visscher PM, Wray NR. Sporadic cases are the norm for complex disease. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(9):1039-43.
37. Falconer DS. The inheritance of liability to diseases with variable age of onset, with particular reference to diabetes mellitus. *Ann Hum Genet*. 1967;31(1):1-20.
38. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;377(2):162-172.
39. Gallo, V., et al., Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: analysis of the EPIC cohort. *Ann Neurol*, 2009. 65(4): p. 378-85.
40. Wang, M.D., et al., Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology*, 2017. 61: p. 101-130.
41. Alonso, A., G. Logroscino, and M.A. Hernan, Smoking and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010. 81(11): p. 1249-52.
42. Gallo, V., et al., Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis: the EPIC cohort. *Neurology*, 2013. 80(9): p. 829-38.
43. O'Reilly, E.J., et al., Premorbid body mass index and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 2013. 14(3): p. 205-11.
44. Chio, A., et al., Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain*, 2005. 128(Pt 3): p. 472-6.
45. Beghi, E., et al., Amyotrophic lateral sclerosis, physical exercise, trauma and sports: results of a population-based pilot case-control study. *Amyotroph Lateral Scler*, 2010. 11(3): p. 289-92.
46. Pupillo, E.B.E.C.A., Sport-related physical activity and amyotrophic lateral sclerosis, in 3rd International Conference of Neurology and Epidemiology. 2012: Nice, France.
47. Longstreth, W.T., et al., Risk of amyotrophic lateral sclerosis and history of physical activity: a population-based case-control study. *Arch Neurol*, 1998. 55(2): p. 201-6.
48. Watanabe, Y. and T. Watanabe, Meta-analytic evaluation of the association between head injury and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Epidemiol*, 2017. 32(10): p. 867-879.
49. Gallo, V., et al., Physical activity and risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis in a prospective cohort study. *European Journal of Epidemiology*, 2016. in press.
50. Vineis, P. and F. Perera, Molecular epidemiology and biomarkers in etiologic cancer research: the new in light of the old. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. 16(10): p. 1954-65.
51. Gallo, V., et al., STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology - Molecular Epidemiology (STROBE-ME): An Extension of the STROBE Statement. *PLoS Med*, 2011. 8(10): p. e1001117.
52. Chadeau-Hyam, M., et al., Meeting-in-the-middle using metabolic profiling - a strategy for the identification of intermediate biomarkers in cohort studies. *Biomarkers*, 2011. 16(1): p. 83-8.
53. Hwang et al. The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. *Nat Rev Neurosci*. 2017 May 18;18(6):347-361.

## 4. PROSPECTS IN THERAPY

### 4.1. OVERVIEW OF GENE THERAPY AND ITS POTENTIAL APPLICATION IN ALS / DR. ERNEST MILIÁN

The rationale behind gene therapy is to use nucleic acids as therapeutic agents to correct a disease generated by a mutated gene. This can be achieved using mainly three strategies: 1) introducing a functional copy of the defective gene 2) using RNA interference (RNAi) to silence a mutant allele and 3) using gene-editing tools to amend the defective gene. Genetic material can be delivered into the cells using chemical compounds (such as cationic polymers, cationic lipids or calcium phosphate) or viral vectors.

Gene therapy has changed dramatically during the last decades since the first human gene transfer experiment in 1989. There are already two therapies approved in Europe, Alipogene tiparvovec, Glybera® (UniQure), a recombinant adeno-associated virus (rAAV) product for lipoprotein lipase deficiency<sup>1</sup>, and Strimvelis® (GSK), a lentivirus vector for severe combined immune deficiency. The rAAV2 product for a congenital form of blindness, Luxturna™ (Spark Therapeutics), has been recently approved in the United States and is likely to be followed by numerous other gene therapies.

At the date of writing this review, there are 13 trials of therapies based on gene therapy in advanced phases (III or IV) opened or recruiting and other 6 trials have been completed (from clinicaltrials.gov). On the other hand, there are 120 trials opened or recruiting in early phase I, phase I and II and 147 trials completed in these phases.

Among the several available viral vectors the most common used are lentivirus, *Adeno-Associated Virus* (AAV) and Adenovirus. All carry mutations in their genome that makes them unavailable to replicate and therefore when they infect the targeted cells they cannot generate new viral particles. For neural system diseases, the choice of a suitable vector is vital as not all the viral vectors for gene therapy are able to cross the brain barrier and have tropism for motor neurons.

Among the available viral vectors, AAVs have emerged as one of the most promising candidates for gene therapy. AAVs are non-pathogenic human viruses that require a helper virus for replicating. Moreover, there are no diseases associated with AAV and the majority of human population have been exposed to AAVs and maintain antibodies against AAVs<sup>2</sup> making them a very safe system. There are several clinical trials based on AAV for Parkinson treatment<sup>3,4</sup>, cystic fibrosis<sup>5,6</sup> and hemophilia<sup>7,8</sup> and, in fact, Glybera, is based on this type of viral vectors<sup>1</sup>. Eleven different serotypes of AAVs have been described but AAV9 has been shown to be the most efficient serotype to cross the brain barrier and target motor neurons<sup>9,10</sup>.

Gene therapy could be used to revert different mutations described in familiar ALS such as SOD1, TDP-43, NEK1 and C9ORF72<sup>11</sup>. In this regard, different strategies can be used for selective blocking of the transcription and/or translation of defective genes and counteract their deleterious effect.

## 4. PERSPECTIVAS EN TERAPIA

### 4.1. PERSPECTIVA GENERAL SOBRE LA TERAPIA GÉNICA Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN ELA / DR. ERNEST MILIÁN

La base de la terapia génica es emplear los ácidos nucleicos como agentes terapéuticos para corregir las enfermedades producidas por genes mutados. Este objetivo puede ser alcanzado empleando para ello principalmente tres estrategias: 1) introducir una copia funcional del gen defectuoso, 2) emplear ADN interferente (RNAi) para silenciar un alelo mutante y 3) emplear herramientas de edición génica para arreglar los genes defectuosos. El material génico puede ser transportado al interior de las células empleando compuestos químicos (como polímeros catiónicos, lípidos catiónicos o fosfato de calcio) o vectores virales.

La terapia génica ha experimentado un cambio dramático durante las últimas décadas desde el primer experimento de transferencia génica en 1989. Actualmente hay dos terapias aprobadas en Europa, Alipogene tiparvovec, Glybera® (UniQure), producto de un virus recombinante adeno-asociado (rAAV) para la deficiencia de lipoproteína lipasa<sup>1</sup>, y Strimvelis® (GSK), un vector de lentivirus para inmunodeficiencia combinada severa. El producto rAAV2 para una forma congénita de ceguera, Luxturna™ (Spark Therapeutics), ha sido recientemente aprobado en los Estados Unidos y parece que le seguirán muchas otras terapias génicas.

En el momento de escribir este documento, hay 13 ensayos clínicos sobre terapias basadas en terapia génica en fases avanzadas (III o IV) abiertas o en reclutamiento y otros 6 ensayos han sido completados (información obtenida en [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Por otra parte, 120 ensayos en fases I temprana, I y II se encuentran abiertos o en reclutamiento, y 147 ensayos clínicos en estas mismas fases han sido completados.

Entre los muchos vectores virales disponibles los más comúnmente usados son los lentivirus, adenovirus asociados (AAV) y adenovirus. Todos ellos portan mutaciones en su genoma que los hacen inviables para replicarse y por tanto, cuando infectan las células diana, no son capaces de generar nuevas partículas virales. Para enfermedades del sistema nervioso, la elección de un vector apropiado es vital, ya que no todos los vectores virales para terapia génica son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y tener tropismo hacia las motoneuronas.

Entre los vectores virales disponibles, los AAVs emergen como uno de los candidatos más prometedores para terapia génica. Los AAVs son virus humanos no patogénicos que requieren de un virus "helper" para replicarse. Es más, no hay enfermedades asociadas con AAV y la mayor parte de la población humana ha resultado expuesta a estos AAVs y mantiene anticuerpos contra ellos<sup>2</sup>. Todo esto hace que sean sistemas muy seguros. Hay varios ensayos clínicos basados en AAV para el tratamiento del Parkinson<sup>3,4</sup>, la fibrosis quística<sup>5,6</sup> y la hemofilia<sup>7,8</sup> y, de hecho, Glybera, se basa en este tipo de vectores virales<sup>1</sup>. Se han descrito siete distintos serotipos de AAVs pero el AAV9 se ha demostrado como el serotipo más eficiente para atravesar la barrera hematoencefálica y dirigirse a las motoneuronas<sup>9,10</sup>.

La terapia génica podría emplearse para revertir distintas mutaciones descritas en ELA familiar como son SOD1, TDP-43, NEK1 y C9ORF72<sup>11</sup>. En este sentido, se pueden emplear distintas estrategias para bloquear selectivamente la transcripción y/o la traducción de genes defectuosos y contrarrestar sus efectos perjudiciales.

Antisense oligonucleotides strategy is based on the use of a complementary sequence to a specific mRNA that can inhibit its expression and then induce a blockade in the transfer of genetic information from DNA to protein. This strategy was successfully tested in mutated SOD1 mice<sup>12,13</sup>, slowing disease onset and improve survival in animal models. A phase 1 study from Ionis Pharmaceuticals in partnership with Biogen was undertaken for SOD1<sup>C93A</sup> mutants using an ASO<sup>14</sup>. Moreover, the same company has conducted preclinical studies using an ASO for *C9ORF72* oligonucleotide expansion<sup>15</sup>.

The RNA interference strategy (RNAi), like in ASO strategy, leads to degradation of RNA transcripts of the target gene. The three most common therapeutic approaches for RNAi are: i) short interference RNAs (siRNA), ii) shRNAs and iii) artificial microRNAs (miRNAs). This approach showed slowed disease progression and extended survival in SOD1 animal models<sup>13,16-21</sup>. Both ASO and RNAi can be hampered by incomplete knock-down, which limits their effectiveness as therapeutics<sup>22</sup>.

Antisense oligonucleotides (ASO) and RNAi have also been designed to suppress *C9ORF72* transcription, reducing the toxicity effect caused by the sequestering of essential RNA-binding proteins (RBP) and the generation of dipeptide repeat proteins in several animal models<sup>23</sup>.

Genome editing offers an alternative approach to treat autosomal disorders. A new system that showed high efficiency, versatility and simplicity is the CRISPR/Cas9 system. This is a complex described for the first time in bacteria as a mechanism to defend against bacteriophage infection. However, this system can recognize DNA specific regions and thanks to this feature it proved to be a very useful tool to edit eukaryotic genomes as well.

In a recent paper from Gaj et al<sup>22</sup>, it was shown that CRISPR/Cas9 can reduce mutant SOD1 protein in the spinal cord following systemic delivery using an AAV9 vector. This genome editing strategy delayed the disease onset, improved motor function and critically increased survival. This work establishes genome editing as a possible therapy for ALS and paves the way for this technology to treat other forms of the disease including those caused by hexanucleotide repeat expansion in the *C9ORF72* gene<sup>24-26</sup>, which could possibly be excised by Cas9 following its coexpression of a pair of sgRNA flanking the repeat expansion.

#### 4.2. TRANSLATING NEURODEGENERATION: MODELS, MECHANISMS AND GENE-BASED THERAPEUTICS / PROF. MIMOUN AZZOZ

The availability of suitable disease models for the study of neurodegenerative conditions is a key factor driving the translation of gene therapies from the bench to their use in patients. Viral vectors have been shown to be useful tools not only in the development of therapies for a wide range of neurodegenerative diseases, but also as a way to generate disease models and to thoroughly investigate the mechanisms of disease.

Las estrategias con oligonucleótidos antisentido (ASO), se basan en el uso de una secuencia complementaria mRNA específica que puede inhibir la expresión de esta e inducir un bloqueo de la transferencia de la información génica del DNA a las proteínas. Esta estrategia ha sido testada satisfactoriamente en ratones mutantes SOD1<sup>12,13</sup>, retardando el inicio de la enfermedad y mejorando la supervivencia en los modelos animales. Un estudio fase I de Ionis Pharmaceuticals en colaboración con Biogen se está llevando a cabo en mutantes SOD1<sup>G93A</sup> empleando un ASO<sup>14</sup>. Además, la misma compañía ha llevado a cabo estudios preclínicos empleando un ASO para las expansiones de oligonucleótidos C9ORF72<sup>15</sup>.

Las estrategias de RNA interferente (RNAi), como las estrategias ASO, conducen a la degradación de los tránscritos del gen diana. Las tres aproximaciones terapéuticas más comunes con RNAi son: i) pequeños RNAs de interferencia (siRNAs), ii) shRNAs y iii) microRNAs artificiales (miRNAs). Estas estrategias se han mostrado eficaces en ralentizar la progresión de la enfermedad y aumentar la supervivencia en modelos animales SOD1<sup>10,16-21</sup>. Tanto ASO como RNAi se pueden ver obstaculizados por expresión reducida incompleta de sus genes (*knockdown incompleta*), lo que limita su efectividad terapéutica<sup>22</sup>.

Se han diseñado ASO y RNAi para suprimir la transcripción de C9ORF72, reduciendo el efecto tóxico causado por el secuestro de proteínas de unión a RNA (RBP, por sus siglas en inglés) y la generación de proteínas formadas por repeticiones de dipéptidos en distintos modelos animales<sup>23</sup>.

La edición genética ofrece una aproximación alternativa para el tratamiento de las enfermedades autosómicas. Un nuevo sistema que ha mostrado su eficiencia, versatilidad y simplicidad es el sistema CRISP/Cas9. Se trata de un complejo descrito por primera vez como mecanismo de defensa bacteriano contra la infección por bacteriófagos. Sin embargo, este sistema puede reconocer regiones específicas de DNA y gracias a esta característica, se trata de una herramienta muy útil también para la edición de genomas eucariotas.

Un artículo reciente de Gaj et al.<sup>22</sup>, muestra que CRISPR/Cas9 puede reducir la proteína mutante SOD1 en la médula espinal tras su administración sistémica empleando un vector AAV9. Esta estrategia de edición genómica retrasó el inicio de la enfermedad, mejoró la función motora e incrementó críticamente la supervivencia. Este trabajo muestra a la edición genética como una posible terapia para la ELA y allana el camino para el tratamiento con esta tecnología de otras formas de la enfermedad, incluidas aquellas causadas por expansiones por repetición de hexanucleótidos en el gen C9ORF72 gene<sup>24-26</sup>, que posiblemente podrían ser escindidas por Cas9 tras co-expresar los dos sgRNA que flanquean estas expansiones de repetición.

#### 4.2. DESCIFRANDO LA NEURODEGENERACIÓN: MODELADO, MECANISMOS Y TERAPIAS BASADAS EN GENES / PROF. MIMOUN AZZOUZ

La disponibilidad de modelos adecuados para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas es un factor clave para trasladar las terapias génicas del laboratorio a su uso en pacientes. Los vectores virales han mostrado ser herramientas útiles no sólo en el desarrollo de terapias para un amplio espectro de enfermedades neurodegenerativas, sino también como herramientas para generar modelos experimentales e investigar los mecanismos de la enfermedad.

Adeno-associated virus (AAV)-mediated disease modeling has recently been used to develop two murine models of C9orf72-linked ALS; one expressing an uninterrupted 10 G4C2 repeat construct and one expressing an interrupted 102-repeat construct (Herranz-Martin et al., 2017). Both lines were generated by delivery of AAV viral vector to the CNS via injection into the cisterna magna of post-natal day 1 mice. This work showed that despite both lines developing similar levels of RNA-foci as a result of the AAV-mediated transgene expression, only the mice expressing the 102-repeat construct developed a pathology consistent with that of ALS/FTD, including: neuromuscular junction (NMJ) abnormalities, movement and behavioral deficits, enhanced apoptosis and the C9-repeat associated non-ATG (C9-RAN) translation products that have been posited to drive C9orf72 related neurodegeneration and pathogenesis. The development of these models has therefore contributed significantly to our understanding of repeat associated pathogenesis in ALS and broaden the availability of *in vivo* models for use in future therapeutic studies.

AAV-mediated disease modeling was also used by our group in a separate study of C9orf72-related ALS/FTD, through the use of a viral construct expressing a V5-tagged 69 repeat poly-GA sequence (Walker et al., 2017). Delivery of this viral construct by injection into the CNS of mice via the cisterna magna resulted in neurodegeneration, NMJ dysfunction, and the appearance of dipeptide repeat aggregates in multiple regions of the brain and spinal cord. This study also included the use of viral constructs as a tool for investigating disease mechanisms at work within C9orf72-related ALS. Primary rat cortical neurons transduced with constructs expressing either 34 or 69 ALS-linked dipeptide repeats showed an increased number of R-loop foci compared with mock transduced cells. R-loops are formed during transcription by the aberrant binding of the nascent RNA strand to GC-rich sequences on the template DNA strand. This displaces binding of the complementary DNA strand and results in the formation of a three-stranded structure that is both very stable and prone to DNA breakage. The presence of R-loops is an indicator of genomic instability and it is hypothesized that the resulting increase in DNA damage may lead to neurodegeneration. As C9orf72-ALS/FTD related repeat expansions are composed entirely of GC sequence, it is therefore likely that the formation of R-loops could therefore be a factor in the neurodegeneration that is characteristic of ALS/FTD.

In addition to higher levels of R-loops, cortical neurons transduced with AAV expressing DPRs showed a reduced response to DNA damage after treatment with camptothecin (CPT), an inducer of DNA double stranded breaks. The expression of disease associated DPRs was shown to inhibit the correct functioning of ATM, thereby affecting recruitment of 53BP1 to the sites of damage and leading to impaired DNA damage repair and subsequent neurodegeneration. AAV-mediated DPR expression *in vivo* also showed evidence of defective ATM signaling, as histological examination of CNS tissue showed nuclear localization of HDAC4, a consequence of increased HDAC4 phosphorylation resulting from a reduction in ATM. Staining for  $\gamma$ H2AX, a protein recruited to the site of DNA double stranded breaks, also showed an increase in DNA damage in

La generación de modelos de enfermedad mediante la aplicación de virus adeno-asociados (AAV, por sus siglas en inglés) ha sido empleada recientemente para el desarrollo de dos modelos murinos de ELA ligada a *C9orf72*; uno de ellos expresa un constructo de diez repeticiones ininterrumpidas G4C2 y el otro expresa un constructo de 102 repeticiones interrumpidas (Herranz-Martin et al., 2017). Ambas líneas fueron generadas aplicando vectores víricos AAV en el sistema nervioso central por inyección en la cisterna magna de ratones postnatales de 1 día de vida. Este trabajo mostró que a pesar de que ambas líneas desarrollaron niveles similares de RNA-foci, como resultado de la expresión transgénica mediada por AAV, sólo el ratón que expresaba el constructo de 102 repeticiones desarrolló una patología consistente con la ELA/DFT, incluyendo: anomalías en la unión neuromuscular, déficits en el movimiento y el comportamiento, apoptosis mejorada y productos de traducción no ATG asociados a repeticiones C9 (C9-RAN) que se han propuesto como directores de la neurodegeneración y la patogénesis relacionadas con *C9orf72*. El desarrollo de estos modelos ha contribuido por tanto a un avance significativo en nuestro entendimiento de la patogénesis asociada a las repeticiones en ELA y a ampliar la disponibilidad de modelos *in vivo* para su uso en futuros estudios terapéuticos.

La generación de modelos de enfermedad mediados por AAV fue empleado también por nuestro grupo en un estudio sobre la relación de *C9orf72* con la ELA/DFT, a través del uso de un constructo viral que expresaba una secuencia poli-GA de 69 repeticiones etiquetadas con V5 (Walker et al., 2017). La distribución de este constructo viral mediante la inyección en el sistema nervioso central de ratones en la cisterna magna dio lugar a neurodegeneración, disfunción de las uniones neuromusculares y la aparición en múltiples regiones del cerebro y la médula espinal de agregados formados por repeticiones de dipéptidos. Este estudio también incluyó el uso de constructos virales como herramienta para investigar los mecanismos de la enfermedad relacionados con *C9orf72* en ELA. Al comparar neuronas corticales primarias de rata transducidas con constructos que expresaban 34 o 69 repeticiones de dipéptidos ligados a la ELA con células en las que se simulaba la transducción, las primeras mostraron un incremento en el número de R-loop foci. Los R-loop se forman durante la transcripción, por la unión aberrante de la cadena naciente de RNA a secuencias ricas en GC en la cadena molde de DNA. Esto hace que se produzca un desplazamiento de la unión en la cadena complementaria de DNA que resulta en la formación de una estructura en tres hilos que es muy estable y promueve la ruptura del DNA. La presencia de R-loops es un indicador de inestabilidad genómica y se cree que del daño en el DNA puede conducir a la neurodegeneración. Puesto que las expansiones de repetición de *C9orf72* relacionadas con la ELA/DFT se componen enteramente de secuencias GC, es probable que la formación de R-loops pueda ser un factor en la neurodegeneración característica de la ELA/DFT.

Además de los mayores niveles de R-loops, las neuronas corticales transducidas con AAV expresan DPRs mostrando una respuesta reducida al daño en el DNA tras el tratamiento con camptothecina (CPT), un inductor de las roturas de doble cadena del DNA. Se demostró que la expresión de DPRs asociados a la enfermedad inhibe el correcto funcionamiento de ATM, afectando por tanto al reclutamiento de 53BP1 en las zonas donde se ha producido el daño e impidiendo su reparación subsecuentemente dando lugar a la neurodegeneración. La expresión *in vivo* de DPR mediada por AAV muestra evidencia además de una señalización defectuosa de ATM, ya que un examen histológico del tejido del sistema nervioso central muestra una localización nuclear de HDAC4, consecuencia del incremento en la fosforilación de HDAC4 producto de una reducción en ATM. La tinción para γH2AX, una proteína reclutada hasta el lugar de ruptura de la

the brainstem of mice injected with 69-GA expressing AAV viral vector. The use of AAV viral vectors therefore demonstrated their suitability as i) a generator of disease relevant models, ii) a powerful tool linking various aspects of DNA damage and DNA damage repair to determine a novel mechanism for neurodegeneration in ALS and iii) a carrier to deliver efficacious gene therapeutics.

#### 4.3. THE VIABILITY OF GENE THERAPY FOR ALS TREATMENT. CHALLENGES AND DIFFICULTIES / DR. ERNEST MILIÁN

##### **Limitation of ALS etiology and genetic information**

The limited understanding of the underlying pathogenesis of ALS is a constraint for gene therapy development; for example, the function of C9ORF72 protein is unknown. However, genetic forms of ALS can provide a solid basis for research. Consistent with this, aberrations in over 25 genetic loci have been identified and linked to ALS phenotype, with new genes constantly being identified. The lack of knowledge can only be overcome with experimental work *in vitro* and with animal models.

##### **Availability of an animal model**

Mouse and rat models carrying mutated forms of *SOD1* gene have provided a crucial understanding of a toxic gain of function in *SOD1* associated ALS.

This is because many strategies have focused on finding a way to reduce the effects related to the *SOD1* gain of function. Successful attempts were achieved in *SOD1* gene-silencing approaches (e.g. various adeno- associated virus (AAV), siRNA, and shRNA constructs, and anti- sense oligonucleotides), showing delayed disease onset and extension of lifespan<sup>11</sup>. Alternatively, other strategies have used a combination of neuroprotective and neurotrophic transgenes (e.g. EAAT2, GDH2, and NRF2) leading to improvements in survival, body weight and neurological findings<sup>27</sup>. The most important setback for these promising results is that it is not clear if these strategies will succeed outside of *SOD1* mutants, meaning, at best, they would treat only 1% of ALS patients. In order to further address this challenge of underlying the pathophysiology of the other 99% of patients, additional research models must be generated. Directly addressing these concerns, there have been efforts to develop other gene-specific murine models (e.g. C9orf72 and NEK1)<sup>28,29</sup>. However, one great difficulty is that the symptomology and histology of ALS in these models are not necessarily the same as in humans<sup>28</sup>. A critical issue is that small-animal and *in vitro* models provide a proof-of-concept but they don't present the same human disease phenotype<sup>28,30</sup>. The result is that few therapies have reached a pre-clinical state and that none have reached the clinic. The new CRISPR/Cas9 system might be the opportunity to generate new transgenic model systems<sup>31</sup>. The efficiency and relative ease-of-use of CRISPR/Cas9 may facilitate disease model generation especially with the poly-nucleotide expansions that occur in many ALS associated mu-

doble hélice de DNA, mostró también un incremento en el daño del DNA en el tronco celular de ratones inyectados con GA-69 expresado por el vector viral AAV. Así, el uso de estos factores virales AAV ha demostrado su idoneidad en i) la generación de modelos de enfermedad relevantes, ii) una poderosa herramienta que asocia varios aspectos del daño en el DNA y los mecanismos de reparación del mismo para determinar un nuevo mecanismo de la neurodegeneración en ELA y iii) un portador para hacer llegar eficazmente terapias génicas.

#### 4.3. LA VIABILIDAD DE LA TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ELA. RETOS Y DIFICULTADES / DR. ERNEST MILIÁN

##### **Limitación de la información sobre la etiología de la ELA y la genética**

Las limitaciones en el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la patogénesis a la ELA son una barrera al desarrollo de terapias génicas; por ejemplo, desconocemos la función de la proteína C9orf72. Sin embargo, las formas genéticas de ELA nos pueden proporcionar una base sólida para la investigación. De acuerdo con esto, se han descrito y asociado al fenotipo de ELA anomalías en más de 25 loci genéticos y nuevos genes se identifican constantemente. La falta de conocimiento solo puede ser superada con trabajos experimentales *in vitro* y con modelos animales.

##### **Disponibilidad de modelos animales**

Los modelos animales de ratón y rata portadores de formas mutadas del gen *SOD1* nos han facilitado una comprensión crucial de la toxicidad que representa la ganancia de función de *SOD1* asociada a la ELA.

Esto ha sido posible porque muchas estrategias se han focalizado en encontrar una manera de reducir los efectos relativos a la ganancia de función de *SOD1*. Se han producido intentos exitosos en aproximaciones de silenciamiento génico de *SOD1* mediante, por ejemplo, virus adenoasociados (AAV), constructos de siRNA y shRNA, y oligonucleótidos antisentido, que han mostrado un retraso en el inicio de la enfermedad y una extensión de la esperanza de vida<sup>11</sup>. De forma alternativa, otras estrategias han empleado una combinación de transgenes neuroprotectores y neurotróficos (p.e. EAAT2, GDH2, y NRF2) que han conseguido mejoras en la supervivencia, el peso corporal y hallazgos neurológicos<sup>27</sup>. El fracaso más importante de estos resultados prometedores es que no queda claro si lograrán su éxito más allá de los mutantes *SOD1*, lo que significaría que, en el mejor de los casos, servirían solo para tratar al 1% de los pacientes de ELA. Para seguir haciendo frente al reto de entender la fisiopatología subyacente del otro 99% de los pacientes, es necesario generar nuevos modelos de investigación. Para abordar directamente este aspecto, se han realizado esfuerzos para desarrollar otros modelos murinos gen-específicos (p.e. C9orf72 and NEK1)<sup>28,29</sup>. Sin embargo, nos encontramos con la gran dificultad de que la sintomatología y la histología de la ELA en estos modelos no tiene por qué coincidir con la que aparece en humanos<sup>28</sup>. Un aspecto crítico es que estos modelos de animales pequeños y modelos *in vitro* nos sirven como prueba de concepto, pero no presentan el mismo fenotipo de la enfermedad en humanos<sup>28,30</sup>. El resultado es que unas pocas terapias han logrado alcanzar una fase pre-clínica y ninguna ha llegado a la clínica. El nuevo sistema CRISPR/Cas9 podría ser una oportunidad para generar nuevos sistemas de modelos transgénicos<sup>31</sup>. La eficiencia y la relativa facilidad de uso de CRISPR/Cas9 podría facilitar la generación de modelos de enfermedad,

tations. To overcome the anatomical and physiological differences between small-animal species and humans, one possible approach is the use of large animal models with more anatomical and physiological similarities such as porcine models<sup>29,30</sup>.

Overall, the development of animal models is progressing rapidly and may provide a space for more robust pre-clinical studies and expanded understanding of the pathophysiology of ALS.

### Selection of an appropriate vehicle

Non-viral vectors are a promising choice due to their low-cost production and safety. However, they have some drawbacks, they present low efficiency and a transient effect requiring repeated administration with increasing risk of immune response<sup>32</sup>.

Viral-vector for delivery of a transgene *in vivo* or *ex vivo* seems the most efficient system to achieve long-term and stable gene expression in the CNS. Current vector options include AAV, adenovirus and lentivirus. Adenovirus have had major improvements in the recent years but are not the ideal choice for ALS treatment due to the strong innate immune response<sup>33</sup>. Lentiviral vectors elicit broad tissue tropism and immediate long-term gene expression. The capacity for genome integration makes lentiviral vectors a favorable choice for *ex vivo* gene therapy. Lentiviral vectors do have drawbacks that limit their use for *in vivo* gene therapy that include limited volumetric spread from the site of infusion, risks of integrational mutagenesis and moderated titers<sup>33</sup>. AAVs are the most frequently used vectors for *in vivo* trials due to their low risk of integrational mutagenesis, low immunogenicity, high titers, large vector spread after infusion and stable gene expression in non-dividing cells. AAVs are not associated with human pathology, making them safe for gene therapy. After infection, the AAV genome is present in the host nuclei in an episomal form, enhancing stability and leading to long-lasting and sustained transcription and translation, over 10 years in human brain<sup>34</sup>. Among the different AAVs serotypes, AAV9, AAV2 and AAV6 can cross the hematoencephalic barrier after systemic administration and showed efficient transfection of neurons and glial cells<sup>32,33</sup>. However, several concerns exist regarding AAV systemic administration. A first concern is the significant vector loss and toxicity due to the off-target distribution, especially to the liver. A second concern is the presence of neutralizing antibodies that can limit the vector effect by systemic infusion.

Viral vectors are better than ASOs at overcoming blood-brain-barrier (BBB) but the delivery speed of intratechinal injections can alter AAV tropism<sup>35</sup>.

A serious constraint of ASOs is the low diffusion in the tissues and the limited cellular uptake and transition to the nucleus. Indeed, it is estimated that <1% of ASOs reach their desired target, as the liver is the major off target receptor. Therefore, repeated injections are necessary but can cause adverse events and toxic ASO accumulation. To improve ASO transport to affected tissues and therefore reduce dosage, two different strategies can be differentiated: 1) use of viral vectors, such as AAVs and 2) non-viral strategies that use cationic molecules.

especialmente con las expansiones de polinucleótidos que aparecen en muchas mutaciones asociadas a la ELA.

Para superar las diferencias anatómicas y fisiológicas entre las especies de pequeños animales y los humanos, una posible aproximación es el uso de modelos animales grandes con más similitud anatómica y fisiológica, como son los modelos porcinos<sup>29,30</sup>.

En general, el desarrollo de modelos animales está progresando rápidamente y podrá facilitar un espacio para estudios pre-clínicos más robustos y para incrementar el conocimiento sobre la fisiopatología de la ELA.

### **La selección de un vehículo adecuado**

Los vectores no virales debido a su bajo coste de producción y su seguridad son una posibilidad prometedora. Sin embargo, tienen algunos inconvenientes: presentan baja eficiencia y un efecto transitorio que requiere la repetición de su administración, lo que conlleva un incremento en el riesgo de una respuesta inmune<sup>32</sup>.

Los vectores virales para el transporte de transgenes *in vivo* o *ex vivo* parecen ser los sistemas más eficientes para lograr la expresión de genes a largo plazo y de forma estable en el SNC. Las opciones actuales en cuanto a vectores incluyen AAV, adenovirus y lentivirus. Los adenovirus han sido mejorados en los últimos años, pero no son la elección ideal para el tratamiento de la ELA debido a que producen una fuerte respuesta inmunológica innata<sup>33</sup>. Los vectores lentivirales logran un amplio tropismo tisular y median la expresión génica a largo plazo. La capacidad para la integración en el genoma hace de los vectores lentivirales una buena opción para terapia génica *ex vivo*. Los vectores lentivirales tienen inconvenientes que limitan su uso para terapia génica *in vivo*, como una extensión volumétrica limitada desde el lugar de infusión, el riesgo de mutagénesis integracional y titulaciones moderadas<sup>33</sup>. Los AAVs son los vectores más frecuentemente usados para tratamientos *in vivo* debido a su bajo riesgo de mutagénesis integracional, baja inmunogenicidad, altas titulaciones, amplia extensión volumétrica tras la infusión y expresión génica estable en células que no están en fase de división. AAVs no están asociados a patologías humanas, lo que hace que su uso en terapia génica sea seguro. Tras la infección, el genoma de los AAV se presenta en el núcleo del huésped en forma episomal, lo que le confiere estabilidad y le permite mantener una transcripción y traslación adecuada a largo plazo, de más de diez años en el cerebro humano<sup>34</sup>. Entre los distintos serotipos de AAVs, los AAV9, AAV2 y AAV6 pueden cruzar la barrera hematoencefálica tras su administración sistémica y muestran una transfección eficiente en neuronas y células gliales<sup>32,33</sup>. Sin embargo, existen distintas consideraciones sobre la administración sistémica de AAV. La primera de ellas es la pérdida significativa de vectores y la toxicidad debida a su distribución fuera de sus dianas (*off-target*), especialmente en el hígado. Un segundo aspecto es la presencia de anticuerpos neutralizantes que pueden limitar el efecto del vector por infusión sistémica.

Los vectores virales se muestran mejores que los ASOs para traspasar la barrera hematoencefálica (BBB por sus siglas en inglés) pero la velocidad de entrada de las inyecciones intratecales puede alterar el tropismo de los AVV<sup>35</sup>.

Una grave limitación de los ASOs es la baja difusión en los tejidos y la limitada captura celular y translocación al núcleo. De hecho, se estima que menos del 1% de los ASOs alcanzan la diana deseada, siendo el hígado su mayor receptor off-target. Por tanto, es necesario realizar inyecciones repetidas que pueden causar eventos adversos y la acumulación tóxica de ASO. Para mejorar el transporte de ASO a los tejidos afectados y poder reducir la dosis, existen dos estrategias diferenciadas: 1) el uso de vectores virales como los AAVs y 2) estrategias no virales como el uso de moléculas catiónicas.

For instance, intravenous (IV) administration of AAV9 combined with silencing RNA showed delayed disease progression and improved survival in mouse models<sup>10,20</sup>.

### Administration routes

Another challenge for *in vivo* gene therapy is the selection of an appropriate surgical delivery system. The ideal administration way would be a non-invasive procedure capable of distributing the vector into the CNS. However, two main infusion options can be differentiated: 1) indirect delivery that includes both intramuscular and intravenous (IV) injection. AAV9 intravenous administration shows robust transduction of neuronal, glial and endothelial cells but a major limitation is the off-target sequestration and therefore the requirement of high viral titers<sup>32,33,36</sup> and 2) Direct delivery to the spinal cord, either intraparenchymal (IP) or intratechal (IT), may circumvent the BBB and high dose titers and off-target sequestration. AAV9 is also the best candidate because of its neurotropic characteristics and spread beyond the infusion site<sup>32,33</sup>.

An important consideration is the drug concentration as both ASO and AAV accumulation may generate a toxic effect. Therefore, it is crucial to find a balance between administrating the right dose of vector without causing a systemic toxic accumulation and adverse side effects. After IV administration, ASOs accumulate in the liver, kidneys and lymph nodes<sup>37</sup> similarly as AAV, as was previously mentioned. ASO can be administered in multiple doses, multiple time points and at increasing concentrations. Nonetheless, this must be tested in animal models to determine the most effective dose and administration patterns to escape host immune responses<sup>35</sup>.

### Time of infusion

Therapeutic timing is also a critical point for gene therapy; a treatment for ALS has more chances of success when a therapy is administered during the initial stages of the disease.

Viral tropism could be impacted by changes in the cell receptor pattern due to time-constrained alterations in the proteome. Therefore, there is likely to be an optimal period for ALS therapy delivery and this highlights the importance of earlier diagnosis<sup>38</sup>.

### Cost

One of the main challenges is the price of the therapy. It has been recently announced by UniQure, the company producing Glybera, that its commercialization will be stopped. This decision is mainly provoked by its low use due to its high price (around one million dollars per treatment). It would be necessary to have a therapy that is affordable. This could be achieved by bioprocess optimization. Usually, production of viral vectors at laboratory scale is performed using adherent cells and culture medium that contains animal serum. When moving to pre-clinical or clinical phases, the need appears to scale-up and use chemically defined media that do not contain any animal compound. There is a need for process development and optimization to increase the quantity and quality of the viral vector, e.g. using suspension cells and completely scalable methods for vector purification.

Por ejemplo, la administración intravenosa (IV) de AAV9 combinada con el silenciamiento de RNA muestra un retraso de la progresión de la enfermedad y una mejora de la supervivencia en modelos murinos<sup>10,20</sup>.

### Vías de administración

Otro reto para la terapia génica *in vivo* es la selección de un sistema quirúrgico de administración adecuado. La vía ideal de administración sería un procedimiento no invasivo capaz de distribuir el vector en el SNC. Sin embargo, se pueden diferenciar dos opciones principales de infusión: 1) distribución indirecta, que incluye tanto la vía de inyección (IV) intramuscular como la intravenosa. La administración intravenosa de AAV9 muestra una transducción robusta de neuronas, células gliales y endoteliales pero su mayor limitación es el secuestro off-target y por tanto la necesidad de altas titulaciones virales<sup>32,33,36</sup> y 2) la distribución directa en la médula espinal, tanto intraparenquimal (IP) como intratecal (IT), que puede burlar la BBB, alcanzar altas titulaciones y evitar el secuestro off-target. AAV9 es también el mejor candidato por sus características neurotrópicas y su propagación desde el lugar de infusión<sup>32,33</sup>.

Una consideración importante es la concentración del fármaco a emplear ya que la acumulación tanto de los ASO como de los AAV puede tener efecto tóxico. Por tanto, resulta crucial encontrar el balance entre la administración de la dosis adecuada de vector y evitar causar su acumulación tóxica a nivel sistémico y sus efectos adversos. Como hemos mencionado previamente, tras su administración por inyección, los ASOs se acumulan en el hígado, riñones y nódulos linfáticos<sup>37</sup> de forma similar a los AAV. Los ASO pueden ser administrados en dosis múltiples, en múltiples momentos temporales y en concentraciones incrementales. No obstante, se debe testar en modelos animales para determinar la dosis más efectiva y los patrones de administración que permitan eludir la respuesta inmune del huesped<sup>35</sup>.

### Tiempos de infusión

Los tiempos terapéuticos son también un aspecto crítico en terapia génica; un tratamiento para la ELA tiene más oportunidades de éxito cuando la terapia se administra en fases iniciales de la enfermedad.

El tropismo viral puede verse impactado por cambios en los patrones de la célula receptora debidos a las alteraciones temporales del proteoma. Por tanto, es probable que haya un periodo óptimo para el suministro de la terapia contra la ELA y esto subraya la importancia de un diagnóstico temprano de la enfermedad<sup>38</sup>.

### Coste

Uno de los mayores retos es el precio de las terapias. UniQure, la compañía que produce el fármaco Glybera, anunció recientemente que detendrá su comercialización. Esta decisión fue provocada principalmente por su bajo uso debido a su alto precio (en torno a un millón de dólares por tratamiento). Sería necesario disponer de una terapia asequible. Esto puede lograrse a través de una optimización de los bioprocessos. La producción habitual de vectores virales a escala de laboratorio viene siendo desarrollada mediante el uso de células adherentes y medios de cultivo que contienen suero animal. Al avanzar a fases pre-clínicas o clínicas, las necesidades se incrementan y es necesario emplear medios químicos libres de compuestos animales. Existe la necesidad de desarrollar y optimizar procesos para incrementar la cantidad y calidad de los vectores virales, p.e., empleando células en suspensión y métodos completamente escalables para la purificación de los vectores.

### **Conclusions**

Gene therapy has emerged as a real therapeutic alternative for very severe conditions. Four gene therapy drugs have been licensed over the past 3 years, indicating that the technology is mature enough. Better vectors have been generated, better non-invasive administration routes investigated, more accurate animal models generated, there is more information and with the advent of more efficient gene editing tools (i.e. CRISPR/Cas9) this could potentially make a leap forward in the amendment of genetic disease and open the door to the treatment of complex disorders like ALS.

## **Conclusiones**

La terapia génica emerge como una alternativa terapéutica real para muchas enfermedades severas. Cuatro fármacos de terapia génica han sido licenciados en los últimos tres años, indicando que la tecnología está en un momento de madurez suficiente. Se han generado mejores vectores, mejores rutas de administración no invasiva, modelos animales más ajustados, hay más información y con la llegada de herramientas más eficientes de edición génica (p.e. CRISPR/Cas9) se podría dar un gran salto en la modificación de las enfermedades genéticas y abrir la puerta a tratamientos de desórdenes complejos como la ELA.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS / BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Ylä-Herttuala S. Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union. *Mol Ther.* 2012;20(10):1831–2.
2. Chahal PS, Schulze E, Tran R, Montes J, Kamen AA. Production of adeno-associated virus (AAV) serotypes by transient transfection of HEK293 cell suspension cultures for gene delivery. *J Virol Methods.* 2014;196:163–73.
3. Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW. Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology.* 2008;70(6309634):1980–3.
4. LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: A double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol. Elsevier Ltd;* 2011;10(4):309–19.
5. Moss RB, Milla C, Colombo J, Accurso FJ, Zeitlin PL, Clancy JP, et al. Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum Gene Ther.* 2007;18(August):726–32.
6. Wagner JA, Nepomuceno IB, Messner AH, Moran ML, Batson EP, Dimiceli S, et al. A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther.* 2002;13(11):1349–59.
7. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Analgesia.* 2003;101(8):2963–72.
8. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med [Internet].* 2006 Mar [cited 2014 May 27];12(3):342–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm1358>
9. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK, et al. Intra-vascular AAV9 preferentially targets neonatal-neurons and adult-astrocytes in CNS. *Nat Biotechnol.* 2009;27(1):59–65.
10. Foust KD, Salazar DL, Likhite S, Ferraiuolo L, Ditsworth D, Ilieva H, et al. Therapeutic AAV9-mediated suppression of mutant SOD1 slows disease progression and extends survival in models of inherited ALS. *Mol Ther.* 2013;21(12):2148–59.
11. Scarrott JM, Herranz-Martín S, Alraifah AR, Shaw PJ, Azzouz M. Current developments in gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(7):1–13.
12. Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, Monia BP, Condon TP, Hung G, et al. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 2006;116(8):2290–6.
13. Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ulzi G, Ramirez A, Rizzuti M, et al. Morpholino-mediated SOD1 reduction ameliorates an amyotrophic lateral sclerosis disease phenotype. *Sci Rep.* 2016;6.
14. Miller TM, Pestronk A, David W, Rothstein J, Simpson E, Appel SH, et al. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol.* 2013 May;12(5):435–42.
15. Scott A. Drug therapy: On the treatment trail for ALS. *Nature.* 2017;550(7676):S120–1.
16. Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun J-C, Guillot S, Haase G, Szulc J, et al. Lentiviral-

- mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med.* Nature Publishing Group; 2005 Apr 13;11(4):423–8.
- 17. Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, Yamanaka K, Christian LJ, Gage FH, et al. Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2005 May;57(5):773–6.
  - 18. Dirren E, Aebischer J, Rochat C, Towne C, Schneider BL, Aebischer P. SOD1 silencing in motoneurons or glia rescues neuromuscular function in ALS mice. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015 Feb;2(2):167–84.
  - 19. Borel F, Gernoux G, Cardozo B, Metterville JP, T. Cabrera G, Song L, et al. Therapeutic rAAVrh10 Mediated SOD1 Silencing in Adult SOD1 (G93A) Mice and Nonhuman Primates. *Hum Gene Ther.* 2016 Jan;27(1):19–31.
  - 20. Stoica L, Todeasa SH, Cabrera GT, Salameh JS, ElMallah MK, Mueller C, et al. Adeno-associated virus-delivered artificial microRNA extends survival and delays paralysis in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Ann Neurol.* 2016 Apr;79(4):687–700.
  - 21. Thomsen GM, Gowing G, Latter J, Chen M, Vit J-P, Staggenborg K, et al. Delayed Disease Onset and Extended Survival in the SOD1G93A Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis after Suppression of Mutant SOD1 in the Motor Cortex. *J Neurosci.* 2014 Nov 19;34(47):15587–600.
  - 22. Gaj T, Ojala DS, Ekman FK, Byrne LC, Limsirichai P, Schaffer D V. In vivo genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS. *Sci Adv.* 2017;3(12).
  - 23. Jiang J, Cleveland DW. Bidirectional Transcriptional Inhibition as Therapy for ALS/FTD Caused by Repeat Expansion in C9orf72. Vol. 92, *Neuron.* 2016. p. 1160–3.
  - 24. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72(2):245–56.
  - 25. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011;72(2):257–68.
  - 26. Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng HJ, Terpstra ML, Zundel CAC, Vieira De Sá R, et al. C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann Neurol.* 2015;78(3):426–38.
  - 27. Benkler C, Barhum Y, Ben-Zur T, Offen D. Multifactorial Gene Therapy Enhancing the Glutamate Uptake System and Reducing Oxidative Stress Delays Symptom Onset and Prolongs Survival in the SOD1-G93A ALS Mouse Model. *J Mol Neurosci.* 2016;58(1):46–58.
  - 28. Picher-Martel V, Valdmanis PN, Gould PV, Julien J-P, Dupré N. From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4(1).
  - 29. Sances S, Bruijn LI, Chandran S, Eggan K, Ho R, Klim JR, et al. Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. Vol. 19, *Nature neuroscience.* 2016. p. 542–53.
  - 30. Yang H, Wang G, Sun H, Shu R, Liu T, Wang CE, et al. Species-dependent neuropathology in transgenic SOD1 pigs. *Cell Res.* 2014;24(4):464–81.
  - 31. Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li X-J. CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener.* BioMed Central; 2015 Aug 4;10:35.
  - 32. Saraiva J, Nobre RJ, Pereira de Almeida L. Gene therapy for the CNS using AAVs: The

- impact of systemic delivery by AAV9. Vol. 241, Journal of Controlled Release. 2016. p. 94–109.
- 33. Choudhury SR, Hudry E, Maguire CA, Sena-Esteves M, Breakefield XO, Grandi P. Viral vectors for therapy of neurologic diseases. Vol. 120, Neuropharmacology. 2017. p. 63–80.
  - 34. Leone P, Shera D, McPhee SWJ, Francis JS, Kolodny EH, Bilaniuk LT, et al. Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. Sci Transl Med. 2012;4(165).
  - 35. Tosolini AP, Sleigh JN. Motor Neuron Gene Therapy: Lessons from Spinal Muscular Atrophy for Amyotrophic Lateral Sclerosis. Front Mol Neurosci. 2017;10(December).
  - 36. Tora MS, Keifer OP, Lamanna JJ, Boulis NM. The challenges of developing a gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis. Expert Review of Neurotherapeutics. 2017;17(4):323–5.
  - 37. Godfrey C, Desviat LR, Smedsrød B, Piétri-Rouxel F, Denti MA, Disterer P, et al. Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies. EMBO Mol Med [Internet]. 2017;9(5):545–57. Available from: <http://embomolmed.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emmm.201607199>
  - 38. Tosolini AP, Morris R. Targeting Motor End Plates for Delivery of Adenoviruses: An Approach to Maximize Uptake and Transduction of Spinal Cord Motor Neurons. Sci Rep. 2016;6.

# SCIENTIFIC COMMITTEE

## SCIENTIFIC COORDINATOR FOR THE ACTIVITY

### Dr. MÓNICA POVEDANO

Hospital of Bellvitge ALS Unit, IDIBELL

Chief of the Clinical Neurophysiology Section of the Hospital of Bellvitge Neurology Department in Barcelona.

Dr. Povedano has been the Coordinator of the Motor Neuron Disease Functional Unit (NDFU) since 2011. She trained in motor neuron diseases at California Pacific Medical Centre (Dr. Miller) and Columbia University (Dr. Mitsumoto).

Dr. Povedano has been recognized with the 2017 Barcelona Physicians' Professional Excellence Award (COMB).

The Motor neuron unit of Bellvitge Hospital is a clinical unit that forms part of ENCALS. It is a clinical unit with more than 15 professionals including staff from

the Miguel Valls Foundation, which provides support to the psychosocial area.

Among other activities, Dr. Povedano collaborates with research groups from the Autonomous University of Barcelona (UAB) (Dr. Navarro), IRB Lleida (Dr. Portero), Research Group on Statistics, Economics and Health (GRECS) of the University of Girona (Dr. Saez-Dr. Barcelo) and with INP-IDIBELL (Dr. Ferrer) on research in neuroinflammation, lipomics, metabolomics, microbiota and environmental georeferencing and epidemiology.

The UFEM group is currently part of two European projects: MinE and STRENGHT.

## COORDINATORS

### Dr. ALBERTO GARCÍA REDONDO

ALS Research Laboratory, ALS Unit. 12 de Octubre University Hospital. CIBERER U-723. Itto. Univ. Inv. Neuroquímica. Dpto. BqBM–UCM. Madrid

Doctor Alberto García Redondo received his doctorate in Molecular Biology at the Autonomous University of Madrid (UAM) in 2004. He currently manages the ALS Research Laboratory at the i+12 Health Research Institute at Hospital 12 de Octubre in Madrid and is a professor at the Biochemistry and Molecular Biology department of the Complutense University of Madrid (UCM).

The ALS Research Laboratory at the 12 de Octubre Hospital is the first center in Spain to have implemented molecular diagnosis of ALS patients, generating

the most relevant genetic information about the characteristics of the ALS population in the country. Furthermore, Dr. García Redondo's group is developing a biomarkers panel to enhance the diagnosis and prognosis of ALS. This work is being carried out with the collaboration of Dr. Osta's lab at the Veterinary School at Zaragoza University. Additionally, and in collaboration with the group of Prof. John Landers, his group has been involved in the discovery of new genes associated with *ALS*: *TUBA4A*, *CCNF*, *NEK1*, *TBK1*, *ANXA11* or *KIF5*.

# COMITÉ CIENTÍFICO

## COORDINADORA CIENTÍFICA DE LA ACTIVIDAD

### Dra. MÓNICA POVEDANO

Unidad Funcional de Enfermedad de la Motoneurona del Hospital de Bellvitge,  
IDIBELL (Hospitalet de Llobregat, Cataluña)

Jefa de Sección de Neurofisiología Clínica del Servicio de Neurología del Hospital de Bellvitge, en Barcelona, la Dra. Povedano es Coordinadora de la Unidad Funcional de Enfermedad de Motoneurona (UFEM) desde el año 2011. Formada en enfermedad de motoneurona en el California Pacific Medical Center (Dr. Miller) y en la Columbia University (Dr. Mitsumoto). La Dra. Povedano ha sido reconocida con el Premio a la Excelencia Profesional 2017 del Colegio de Médicos de Barcelona (COMB).

La UFEM del hospital de Bellvitge es una unidad clínica, que forma parte del ENCALS. Se trata de una unidad clínica con más de 15 profesionales entre los que

hay personal de la Fundación Miquel Valls, dando apoyo el área psicosocial.

Entre otros, la UFEM colabora con grupos de investigación de la Universidad Autónoma de Barcelona “UAB” (Dr. Navarro), IRB LLeida (Dr. Portero), Research Group on Statistics, Econometrics and Health (GRECS) de la Universitat de Girona (Dr. Sáez-Dra. Barceló), y con INP-IDIBELL (Dr. Ferrer) en líneas de investigación en neuroinflamación, lipidómica, metabolómica, microbiota y georreferenciación y epidemiología ambiental.

En la actualidad, el grupo de la UFEM forma parte de dos proyectos europeos: MinE y STRENGHT.

## COORDINADORES

### Dr. ALBERTO GARCÍA REDONDO

Laboratorio de investigación en ELA, Unidad de ELA del Hospital Universitario 12 de octubre, i+12. CIBERER U-723. Itto. Univ. Inv. Neuroquímica. Dpto. BqBM-UCM (Madrid, Comunidad de Madrid)

El doctor Alberto García Redondo realizó su doctorado en Biología Molecular en la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) en el año 2004. Actualmente dirige el laboratorio de Investigación en ELA del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital 12 de Octubre de Madrid “i+12”, y es profesor en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

El laboratorio de Investigación en ELA del Hospital 12 de Octubre es el primer centro de España que ha implantado el diagnóstico molecular de pacientes

con ELA, generando el fondo de información más relevante sobre las características genéticas de la población con ELA en nuestro país. Además, se encuentran en el proceso de desarrollar, junto con el laboratorio de la Dra. Osta de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, un panel de biomarcadores que permitan mejorar el diagnóstico y el pronóstico de la ELA. Asimismo, y en colaboración con el laboratorio del Dr. Landers, ha participado en el hallazgo de nuevos genes relacionados con la ELA: *TUBA4A*, *CCNF*, *NEK1*, *TBK1*, *ANXA11* o *KIF5*.

**Dr. ANA CRISTINA CALVO ROYO**

LAGENBIO, Veterinary Faculty of Zaragoza, University of Zaragoza, Health Research Institute of Aragon, IIS

Since 2004, Dr. Ana Cristina Calvo has been a member of the LAGENBIO (TERAGEN and REGENERAGEN) research group, recognized by the Government of Aragon, and since 2015 she has been an assistant professor of Genetics in the Department of Anatomy, Embryology and Animal Genetics. The line of research in which she is mostly involved in this group under the direction of Dr. Rosario Osta is mainly focused on the search of prognostic biomarkers in transgenic SOD1-G93A mice and in samples from ALS patients. To advance in this line of research, Dr. Calvo completed her postdoctoral studies

in the ALS Unit of the Hospital 12 October in Madrid (Spain) under the direction of Dr. Alberto García Redondo, and in the Faculty of Medicine at the Autonomous University of Barcelona (Spain) under the direction of Dr. José Aguilera. In this latter postdoctoral stay, Dr. Calvo studied in greater depth a non-viral gene therapy approach in the NSC-34 cell line, a cellular model for ALS. She is the co-author of four licensed patents, and she has published 32 scientific articles indexed in the JCR, 18 of them in the first tertile of their category, and 9 of them as a first author.

**Dr. PEDRO VIZÁN**

Centre for Genomic Regulation (CRG), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona

Pedro Vizán finished his degree in Biology at University of Barcelona in 2001 before starting his PhD in the Integrative Systems Biology, Metabolomics and Cancer group led by Prof. Marta Cascante, which was defended in March 2007. His research interest during his PhD was focused on the metabolism of tumor progression. In 2008, Dr. Vizán moved to London, where he joined the Developmental Signaling group led by Dr. Caroline Hill at the London Research Institute (Cancer Research UK). Dr. Hill's group has an excellent international reputation and extensive

knowledge of the fields of signaling and cancer. In September 2012, Dr. Vizán returned to Barcelona with the Epigenetic Events in Cancer group, led by Dr. Luciano Di Croce at the Centre for Genomic Regulation (CRG). The lab is focused on studying how the epigenetic status of the cell is controlling gene expression and, consequently, its function. Among other merits, Dr Vizán has published 20 peer reviewed scientific articles during his career, 18 of them in the first quartile of their category and 8 of them as a first author.

**Dra. ANA CRISTINA CALVO ROYO**

LAGENBIO, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, Universidad de Zaragoza, Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón, IIS (Zaragoza)

Desde el año 2004 hasta la actualidad la Dra. Ana Cristina Calvo es miembro del grupo de investigación LAGENBIO (TER-RAGEN and REGENERAGEN), reconocido por el Gobierno de Aragón, y desde 2015 es profesora contratada doctora en Genética en el Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal. La línea de investigación en la que centra su trabajo principalmente bajo la dirección de la Dra. Rosario Osta, se focaliza en la búsqueda de marcadores de pronóstico en ratones transgénicos SOD1-G93A y en muestras de pacientes de ELA. Para avanzar en esta línea de investigación, la Dra. Calvo completó sus estudios postdoctorales en

la unidad de ELA del Hospital Universitario 12 de octubre en Madrid (España) bajo la dirección del Dr. Alberto García Redondo, y en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona (España) con la dirección del Dr. José Aguileira. En esta última estancia postdoctoral, la Dra. Calvo estudió en profundidad una aproximación terapéutica a la terapia génica no viral en líneas celulares NSC-34, un modelo celular de ELA. Es coautora de cuatro patentes licenciadas, y ha publicado 32 artículos indexados en el JCR, 18 de los cuales se encuentran en el primer tercilio de su categoría, nueve de ellos como primer autor.

**Dr. PEDRO VIZÁN**

Centro de Regulación Genómica (CRG), Instituto de Ciencia y Tecnología de Barcelona (Barcelona)

Pedro Vizán finalizó sus estudios en Biología en la Universidad de Barcelona en 2001, antes de comenzar su doctorado en el grupo de Biología de Sistemas Integrativos, Metabolómica y Cáncer, liderado por la profesora Marta Cascante, defendiendo su tesis doctoral en marzo de 2007. Sus intereses en el campo de la investigación se centraron en el metabolismo de la progresión tumoral. En 2008, el Dr. Vizán se trasladó a Londres, donde se unió al grupo de Señales del Desarrollo liderado por la Dra. Caroline Hill en el Instituto de Investigación de Londres (Cancer Research, Gran Bretaña). El grupo de la Dra. Hill

tiene reconocido prestigio internacional y un amplio conocimiento en los campos de señalización y cáncer. En septiembre de 2012, el Dr. Vizán vuelve a Barcelona, al grupo de Eventos Epigenéticos en cáncer, liderado por el Dr. Luciano Di Croce en el Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona). El laboratorio se centra en el estudio de cómo el estado epigenético de la célula controla la expresión y, consecuentemente, su función. Entre otros méritos el Dr. Vizán ha publicado 20 artículos científicos durante su Carrera, 18 de ellos en el primer cuartil de su categoría, ocho de ellos como primer autor.

**Dr. MARÍA ANTONIA BARCELÓ**

Associated Professor in Statistics and Econometrics, University of Girona. Research Group on Statistics, Econometrics and Health, GRECS, University of Girona and CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP)

María Antonia Barceló Rado has a PhD in Mathematics (2001) and has been an associate professor in Statistics and Econometrics at the University of Girona since 2003. She has also been an adjunct professor at the Open University of Catalonia since 2005. Dr. Barceló was a research assistant at the Municipal Institute of Medical Research (currently ISI-GLOBAL) in Barcelona and INSALUD in Palma de Mallorca. She is a member of the Research Group on Statistics, Econometrics and Health (GRECS) of the University of Girona and of the CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP). Dr. Barceló is also an associate researcher at the Centre for Research in Health Economics (CRES) at Pompeu Fabra University. A member of the METHAGRECS research group on cardiovascular risk factors of the Research Institute for Primary Research (IDIAP) in

Girona, Dr. Barceló collaborates with the Functional Unit of Motor neuron Disease at the University Hospital of Bellvitge.

Her lines of research are Statistics, Environmental Epidemiology and Clinical Epidemiology, in diseases such as ALS, attention deficit hyperactivity disorder, hypertension and other cardiovascular diseases.

Dr. Barceló is the author of more than 45 papers published in journals indexed in the JCR ISI database, over 15 of them located in the first quartile, and has published 9 books and 2 book chapters. She has led three competitive projects at the national level and 1 at the regional level, as principal investigator. A researcher in two European projects, one of them currently active as well as 4 national and 5 regional ones, Dr. Barceló has jointly led 15 research contracts and 10 agreements.

**Dr. ERNEST MILIÁN**

VCN Biosciences, Barcelona

Ernest Milián finished his degree in Biotechnology at the Autonomous University of Barcelona in 2002. He then started his PhD in the Group of Cell Culture and Bioprocess led by Prof. Francesc Gòdia, which was defended in March 2013. Prof. Francesc Gòdia is a pioneer in cell culture and vector producing strategies in our country. His group works in process development for viral vectors and recombinant vaccines. Dr. Milián's research interest during his PhD was focused on cell death by apoptosis of the hybridoma cell line. He worked at Pfizer as a scientist in the R&D department improving the production of vaccines for animal health. In

2014, he moved abroad to Canada to obtain more experience and acquire new technical skills, especially in vaccine development and gene therapy. Dr. Milián was hired at the Viral Vectors and Vaccine group led by Prof. Amine Kamen at the Department of Bioengineering at McGill University (Montreal, Canada). Prof. Kamen's group has an excellent international reputation and wide knowledge of the field of viral vector development for vaccine and gene therapy purposes. In June 2017, Dr. Milián returned to Barcelona to join VCN Biosciences, a company devoted to the production of viral vectors for cancer treatment.

**Dra. MARÍA ANTONIA BARCELÓ**

Profesor Asociado en Estadística y Econometría, Universidad de Gerona. Grupo de Investigación en Estadística, Econometría y Salud, GRECS, Universidad de Girona. CIBER de Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP (Girona)

María Antonia Barceló Rado es doctora en Matemáticas (2001) y profesora titular en Estadística y Econometría en la Universidad de Girona desde 2003. Es además profesora colaboradora de la Universitat Oberta de Catalunya desde 2005. Fue ayudante de investigación en el Instituto Municipal de Investigación Médica (actualmente ISI-GLOBAL) en Barcelona y en el INSALUD en Palma de Mallorca. Es miembro del Grupo de Investigación en Estadística, Econometría y Salud (GRECS) de la Universidad de Girona y del CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Asimismo, es investigadora asociada del Centro de Investigación en Economía de la Salud (CRES) de la Universidad Pompeu Fabra. Es miembro también del grupo de investigación METHAGRECS, sobre factores de riesgo cardiovasculares del Instituto de Investigación en Investigación Primaria (IDIAP) en Girona. Colabora con la

Unidad Funcional de la Enfermedad de la Motoneurona del Hospital Universitario de Bellvitge.

Sus líneas de investigación son la Estadística, la Epidemiología Ambiental y la Epidemiología Clínica, en enfermedades tales como la esclerosis lateral amiotrófica, el trastorno de déficit de atención e hiperactividad, la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares.

Es autora de más de 45 artículos publicados en revistas indexadas en la base JCR ISI, más de 15 de ellos situados en el primer cuartil. Ha publicado 9 libros y 2 capítulos de libros. Ha liderado tres proyectos competitivos a nivel nacional y 1 a nivel autonómico. Ha participado como investigadora en dos proyectos europeos, uno de ellos activo actualmente, 4 a nivel nacional y 5 a nivel autonómico. Ha co-liderado 15 contratos de investigación y 10 convenios.

**Dr. ERNEST MILIÁN**

VCN Biosciences (Barcelona)

Ernest Milián finalizó su grado en Biotecnología en la Universidad Autónoma de Barcelona en 2002. Realizó su tesis doctoral en el Grupo de Cultivo Celular y Bioprocessos liderado por el profesor Francesc Gòdia, trabajo que defendió en marzo de 2013. El profesor Francesc Gòdia es pionero en cultivos celulares y estrategias para la producción de vectores en nuestro país. El trabajo de su grupo se centra en el desarrollo de procesos para vectores virales y vacunas recombinantes. Durante su periodo de doctorado los intereses del Dr. Milián se centraron en la muerte celular por apoptosis en líneas celulares de hibridoma. Trabajó como científico en Pfizer en el departamento de I+D mejorando la producción de vacunas para

salud animal. En 2014, se trasladó a Canadá para adquirir mayor experiencia y nuevas habilidades técnicas, especialmente en desarrollo de vacunas y terapia génica. Se incorporó al grupo de Vectores Virales y Vacunas, liderado por el profesor Amine Kamen en el Departamento de Bioingeniería en la Universidad McGill (Montreal, Canadá). El grupo del profesor Kamen es un grupo de excelencia y referencia internacional y en el campo del desarrollo de vectores virales para el desarrollo de vacunas y terapia génica. En junio de 2017, el Dr. Milián vuelve a Barcelona para unirse a VCN Biosciences, una compañía dedicada a la producción de vectores virales para el tratamiento del cáncer.

## INTERNATIONAL SPEAKERS

### Prof. JOHN LANDERS

University of Massachusetts Medical School

Professor John Landers is one the main figures in ALS research worldwide. He is Professor of Neurology at the University of Massachusetts. He contributed to the establishment of the FALS Sequencing Consortium and is the USA leader of the MinE project. He is a reviewer at the ALS Canada/Brain Canada International Peer Review Panel.

Prof. Landers' main scientific contributions to the study of ALS are centered on the identification of genes linked to Familial ALS (FALS) and the study of cytoskeleton defects on the neurodegeneration pathways in this disease.

Highlighted findings by his group include the identification of mutations in *PFN1* and *TUBA4A*, both genes tightly associated with cytoskeleton dynamics. This study is the largest effort at sequencing exomes in FALS today and represents one of the first successful analyses of rare variants of new genes involved in diseases. Dr. Landers' team recently optimized this approximation, a process that has led to the discovery of *NEK1* as a gene associated with ALS.

### Dr. CATERINA BENDOTTI

Molecular Neurobiology Lab, "Mario Negri" Department of Neuroscience. Institute for Pharmacological Research

Dr. Caterina Bendotti graduated in Pharmacy from the University of Milano in 1984 and obtained a PhD in Neuropharmacology at the Mario Negri Institute (IRFMN) in 1986. From 1986 to 1988, she completed a post doc at the Genetic Developmental Lab, Dept. of Physiology at Johns Hopkins University, Baltimore, USA. From 1988-1992, Dr. Bendotti was a research assistant in the Neuropharmacology Laboratory; in 1992, she was Head of the Unit and from 1998 on, Head of the Molecular Neurobiology Lab at the IRFMN.

Dr. Bendotti is a member of scientific advisory boards (SINS, MND, TLF, AISLA), editorial boards (J.N.C.; CNS & ND-DT), international meetings (MND, ENCALS), a co-organizer of scientific meetings on ALS (2007, 2010, 2014, 2016). Co-author of 160 articles (H index=42). Her main current research interest is understanding the mechanisms underlying variability in ALS disease progression in order to identify biomarkers and specific therapeutic targets for modifying disease progression.

## PONENTES INTERNACIONALES

### Prof. JOHN LANDERS

University of Massachusetts Medical School (Estados Unidos)

El profesor John Landers es una de las principales figuras de la investigación en ELA a nivel mundial. Es profesor de Neurología en la Universidad de Massachusetts. El profesor Landers contribuyó al establecimiento del FALS Sequencing Consortium y es líder en USA del proyecto MinE. Actúa como revisor del ALS Canada/Brain Canada International Peer Review Panel y es miembro del comité asesor externo del consorcio ALStar (Horizon 2020), entre otras posiciones.

Sus principales contribuciones científicas al estudio de la ELA se centran en la identificación de genes ligados a la ELA familiar (FALS) y en el estudio de los

defectos en el citoesqueleto en las vías de neurodegeneración en esta enfermedad.

Entre los hallazgos más destacados de su equipo se incluyen la identificación de mutaciones en *PFN1* y *TUBA4A*, ambos genes estrechamente asociados a la dinámica del citoesqueleto. Este estudio es el mayor esfuerzo en secuenciación de exomas en FALS hasta la fecha y representa uno de los primeros análisis exitosos de variantes raras de nuevos genes implicados en la enfermedad. El equipo del profesor Landers ha optimizado esta aproximación a la enfermedad, descubriendo recientemente un nuevo gen asociado a la ELA: *NEK1*.

### Dra. CATERINA BENDOTTI

Laboratorio de Neurobiología Molecular, Departamento de Neurociencias “Mario Negri”, Instituto para la Investigación Farmacológica (Italia)

La Dra. Caterina Bendotti se graduó en Farmacia en la Universidad de Milán en 1984, y obtuvo su Título de Doctor en Neurofarmacología en el Instituto Mario Negri (IRFMN) en 1986. Desde 1986 a 1988 completó una estancia postdoctoral en el Laboratorio de Genética del Desarrollo, en el Departamento de Fisiología de la Universidad Johns Hopkins (Baltimore, USA). Desde 1988 hasta 1992 fue ayudante doctor en el Laboratorio de Neurofarmacología, en 1992 alcanzó la dirección de la Unidad y desde 1998 dirige el Laboratorio de Neurobiología Molecular en el IRFMN.

La Dra. Bendotti es miembro de diversos comités científicos (SINS, MND, TLF, AISLA), editora de distintas revistas (JNC, CNS & ND-DT), participa en reuniones internacionales (MND, ENCALS), y en la organización de reuniones científicas en ELA (2007, 2010, 2014, 2016). Es coautora de 160 artículos (índice h = 42). Su trabajo se centra actualmente en comprender los mecanismos que subyacen a la variabilidad de la progresión de la ELA, con el objetivo de identificar biomarcadores y dianas terapéuticas específicas que permitan modificar la progresión de la enfermedad.

**Prof. AMMAR AL-CHALABI**

King's College of London, and King's MND Care and Research Centre Director

Dr. Al-Chalabi is one of the most relevant researchers on the international scene. Ammar Al-Chalabi is Professor of Neurology and Complex Disease Genetics at King's College London and consultant neurologist at King's College Hospital, where he is Director of the King's Motor Neuron Disease Care and Research Centre. His research is focused on identifying genetic and environmental risk and modifying factors for ALS, and their relationship with phenotype. Dr. Al-Chalabi's

team have identified or co-identified several of the major ALS genes, proposed the multistep model of ALS, and developed the King's ALS staging system, now in use and certified in 14 countries, including the USA and Australia. He has been the recipient of the MND Association Charcot Young Investigator Award, and the American Academy of Neurology and ALS Association Sheila Essey Award, both for outstanding research into ALS.

**Dr. VALENTINA GALLO**

Queen Mary University of London

Dr. Valentina Gallo is a Senior Lecturer in Epidemiology, joining QMUL in October 2012. She is a neuro-epidemiologist with a background in both clinical neurology and epidemiology. She graduated in Medicine in 2000 at La Sapienza University of Rome, where she also obtained her clinical qualification as a Neurologist in 2005. She attended the MSc in Demography and Health at LSHTM in 2003-04.

Before joining QMUL, Dr. Gallo worked as Research Associate at the School of Public Health, at Imperial College London, collaborating closely with Professor Paolo Vineis on a number of projects; and as Clinical Lecturer in Epidemiology at the London School of

Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM) on the C8 Health Project with Dr. Tony Fletcher and the other members of the team on the health effects of perfluorinated compound exposure.

Dr. Gallo's main fields of interests include neuroepidemiology. She is currently investigating risk factors for ALS and Parkinson's disease.

In June 2016, Dr. Gallo was awarded a major grant entitled "BRain health and healthy AgeING in retired Rugby players, the BRAIN study" by the Drake Foundation, together with Prof. Neil Pearce (LSHTM) and Dr. Damien McElvenny (IoM).

**Prof. AMMAR AL-CHALABI**

King's College of London, and King's MND Care and Research Centre Director  
(Gran Bretaña)

El profesor Ammar Al-Chalabi es una de las principales figuras del panorama internacional de la investigación en ELA. Es profesor de Neurología y Genética de Enfermedades Complejas en el King's College London y consultant neurologist en el King's College Hospital, en el que ocupa el cargo de Director del Centro de Asistencia e Investigación de la Enfermedad de la Motoneurona.

Su investigación se focaliza en la identificación de factores de riesgo y de origen genético y medioambiental y su relación con el fenotipo. Su equipo ha

identificado o co-identificado varios de los principales genes relacionados con la ELA, proponiendo el modelo “multi-paso” de ELA, y desarrollando el sistema estándar de tratamiento de la ELA en el King's, en uso y certificado en 14 países, entre los que se cuentan USA o Australia. Entre otros reconocimientos, le han sido otorgados el premio Charcot Young Investigator de la Asociación MND, y el premio Sheila Essey de la Academia Americana de Neurología y la ALS Association, ambos por la excelencia en el campo de la investigación en ELA.

**Dra. VALENTINA GALLO**

Queen Mary University of London (Gran Bretaña)

La Dra. Valentina Gallo es profesora titular de Epidemiología en la Universidad Queen Mary de Londres a la que se incorporó en octubre de 2012. Neuroepidemióloga, especialista en neurología clínica y antecedentes epidemiológicos, se graduó en 2000 en la Universidad “La Sapienza” de Roma, donde obtuvo también su título clínico como neuróloga en 2005. Asistió a la Maestría en Demografía y Salud en LSHTM en 2003-04.

Antes de unirse a QMUL, la Dra. Gallo trabajó como Investigadora Asociada en la Escuela de Salud Pública, en el Imperial College de Londres, colaborando estrechamente con el Profesor Paolo Vineis. Asimismo, ocupó el puesto de Profesor Clínico en Epidemiología en la Escuela de

Higiene y Medicina Tropical de Londres (LSHTM), colaborando con el equipo del Dr. Tony Fletcher estudiando el efecto en la salud de la exposición a compuestos perfluorados.

Los principales campos de interés de la Dra. Gallo incluyen la neuroepidemiología. Actualmente se centra en la investigación de los factores de riesgo para la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson.

Desde junio de 2016, desarrolla entre otros el proyecto BRAIN: “Salud y envejecimiento saludable en jugadores retirados de rugby” de la Fundación Drake junto con el profesor Neil Pearce (LSHTM) y el Dr. Damien McElvenny (IoM).

**Prof. MIMOUN AZZOZ**

Sheffield Institute for Translational Neuroscience, Sheffield University, UK

Professor Azzouz is Chair of Translational Neuroscience and Director of Research & Innovation in the Dep. of Neuroscience, Sheffield Institute for Translational Neuroscience. He has achieved international pre-eminence in the field of gene therapy applications and vector development for neurodegenerative diseases. His original and pioneering work, which has already produced major breakthroughs in animal models of neurodegenerative diseases, will in the near future, translate into major therapeutic advances in the field of human neurodegenerative disease.

Prof. Azzouz's achievements go beyond the development of therapy. Indeed, he has also made significant discoveries

related to the mechanisms of diseases in ALS/MND and SMA. For example, the recent discovery of the mechanism underpinning genome instability and neural cell death caused by *C9orf72* expansion and the role of PTEN. Prof. Azzouz's exceptional achievements were recently recognized on the European level by winning the prestigious ERC Advanced Investigator and ERC PoC Awards designed for individuals with excellence in scientific research. These awards offer him a platform to cement his European leadership in the field of gene therapy and translational neuroscience.

**Prof. MIMOUN AZZOZ**

Sheffield Institute for Translational Neuroscience, Sheffield University (Gran Bretaña)

El profesor Azzouz es director de Neurociencia Traslacional y Director de I+D+i en el departamento de Neurociencias del Instituto Sheffield para la Neurociencia Traslacional. Ha logrado el reconocimiento internacional en el campo de las aplicaciones de terapia génica y el desarrollo de vectores para enfermedades neurodegenerativas. Sus pioneros trabajos podrán, en un futuro no lejano, aplicarse en avances terapéuticos en el campo de las enfermedades neurodegenerativas.

Los logros del profesor Azzouz se centran en el desarrollo de terapias. Ha realizado descubrimientos significativos

en los mecanismos de enfermedad en ELA/EMN y SMA. Entre ellos, el reciente descubrimiento del mecanismo relacionado con la inestabilidad genómica y muerte celular causada por las expansiones de *C9orf72* y el rol de PTEN. Estos logros han sido recientemente reconocidos a nivel europeo a través de la concesión de una ayuda ERC Advance Investigator y el premio ERC PoC, orientados a la excelencia en la investigación científica. Estos reconocimientos le han ofrecido una plataforma para cimentar su liderazgo europeo en el campo de la terapia génica y la neurociencia traslacional.

## NATIONAL SPEAKERS

### Dr. ADOLFO LÓPEZ DE MUNAIN ARREGUI

Neurology Service, Donostia University Hospital -Biodonostia Health Research Institute, CIBERNED, San Sebastián

Dr. López de Munain combines his clinical activity with research focused on neurogenetic research with contributions in several areas of Neurology. In addition to the main line in neuromuscular diseases, he actively participates in the design and implementation of other lines of clinical and molecular research in neurodegenerative diseases (frontotemporal dementia, prion diseases, ALS and Parkinson's disease among others) and multiple sclerosis. Dr. López de Munain organized REIG (Spanish Multidisciplinary Glioblastoma Research Group Network). He is the author or co-author of more than 225 peer-reviewed articles, 26 book chapters and more than 400 communications to national and international conferences and invited lectures and has directed or codirected 15 doctoral theses.

Dr. López de Munain is an active member of the Spanish Society of Neurology, where he served as coordinator of the study groups on Neuromuscular Diseases and Neurogenetics. He also served as President of the Neurology Society of the Basque Country (2012-2016). He is also

an active member of the Spanish Association of Human Genetics, the World Muscle Society and Eusko Ikaskuntza (Basque Studies Society). Dr. López de Munain is also the founder of NEUROGENES, which integrates professionals from different disciplines interested in the development of Neurogenetics, REDELA and DEGESCO (research networks in ALS and dementia disorders). He is a member of the Editorial Board of various journals and an expert on various association committees.

Dr. López de Munain is the current PI of the Donostia group at the Centre for Biomedical Network Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED) and is a member of its Steering Committee. In addition, he leads one of the nodes of the DNA and tissue bank. He participates on the board of the Matia Foundation and the Tecnalia Division of Health and Quality of Life Council. In addition to his career as a neurologist and biomedical researcher, he has a BSc in Historic Sciences and is Professor of Neurology at the University of the Basque Country.

## PONENTES ESPAÑOLES

### Dr. ADOLFO LÓPEZ DE MUNAIN ARREGUI

Neurology Service, Donostia University Hospital -Biodonostia Health Research Institute, CIBERNED (San Sebastián, País Vasco)

El Dr. Adolfo López de Munain Arregui combina su actividad clínica con la actividad investigadora, centrada en la investigación en Neurogenética con contribuciones en distintos campos de la Neurología. Paralelamente, participa activamente en el diseño e implementación de otras líneas de investigación clínica y molecular en enfermedades neurodegenerativas (demencia frontotemporal, enfermedades priónicas, ELA y Parkinson, entre otras) y esclerosis múltiple y es organizador de la Red Española de Investigación Multidisciplinar en Glioblastoma.

Es autor o co-autor de más de 225 artículos, 26 capítulos de libro y más de 400 comunicaciones nacionales e internacionales y lecturas invitadas, dirigiendo o codirigiendo 15 tesis doctorales. Es miembro activo de la Sociedad Española de Neurología, en la que coordina el grupo de Enfermedades Neurodegenerativas y Neurogenética. También ha ocupado el puesto de presidente de la Sociedad de Neurología del País Vasco (2012-16).

El Dr. López de Munain es miembro activo de la Asociación Española de Gené-

tica Humana, la Sociedad Mundial Muscular y la Sociedad Vasca de Estudios (Eusko Ikaskuntza). Es además fundador de NEUROGENES, que integra profesionales de distintas disciplinas interesadas en el desarrollo de la Neurogenética, REDELAy DEGESCO (redes de investigación en ELA y demencias). Participa como miembro en el Comité Editorial de distintas revistas y como experto en distintos comités de asociaciones.

Actualmente, el Dr. López de Munain lidera uno de los grupos de investigación del Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) y forma parte de su comité de dirección. Asimismo, lidera uno de los nodos del banco de ADN y tejidos. Participa en el comité de la Fundación Matía y en el consejo de la División de Salud y Calidad de Vida de Tecnalía. Además de su carrera como neurólogo e investigación biomédica, es BSc en Ciencias Históricas y Profesor de Neurología en la Universidad del País Vasco.

**Dr. ROSARIO OSTA**

LAGENBIO, Veterinary School of Zaragoza, University of Zaragoza, Health Research Institute of Aragon, IIS

Dr. Rosario Osta is a professor of Genetics in the University of Zaragoza. She has participated in more than 60 research projects, 15 of which come from national grants, 6 European, 15 regional, 6 from the University of Zaragoza and the remainder from different companies and foundations. She is coauthor in more than 120 articles and more than 200 national and international communications, as well as invited lectures. She has supervised 12 doctoral thesis.

She is the leader of TERAGEN reference line of research that is recognized as LAGENBIO consolidated research group by the Government of Aragon. As the leader of the LAGENBIO (TERAGEN and REGENERAGEN) research group, Dr. Osta is responsible for different lines of research from the characterization and search for biomarkers in animal models and

samples from ALS patients to potential therapeutic strategies in animal models based on cellular and the non-viral fragment C tetanus toxin.

Regarding Technological Transfer, Dr. Osta is coauthor of 9 patents. The majority of these patents are licensed. She also participates in many research agreements with companies. On the other hand, since July 2012 to date, she has been the Director of the Secretariat of the Vice-Chancellor for Technological Transfer and Innovation of the University of Zaragoza and she is currently a member of the Spin-off Committee of the University of Zaragoza. In addition, she participates in some Evaluation Committees (she is an evaluator of the National Agency for the Assessment of Quality and Accreditation, FIS, Eu-Lac).

**Dra. ROSARIO OSTA**

LAGENBIO Facultad de Veterinaria de Zaragoza, Universidad de Zaragoza, Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón, IIS (Zaragoza)

Dra. Rosario Osta es catedrática de Genética en la Universidad de Zaragoza. Ha participado en más de 60 proyectos o contratos de Investigación, 15 de convocatorias nacionales, 6 europeos, 15 de convocatorias regionales, 6 de la Universidad de Zaragoza y el resto con distintas empresas o fundaciones.

Es autora o co-autora de más de 120 artículos y más de 200 comunicaciones nacionales e internacionales y lecturas invitadas, dirigiendo o codirigiendo 12 tesis doctorales.

Es responsable de la línea TERAGEN del grupo de investigación de referencia reconocido por el Gobierno de Aragón LAGENBIO y es co-coordinadora del programa de “Neurociencias y Salud Mental del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón”. Como responsable del grupo de investigación LAGENBIO (TERAGEN and REGENERAGEN) la Dra. Osta lidera distintas líneas de investigación que abar-

can desde la caracterización y búsqueda de biomarcadores en modelos animales y muestras de pacientes de ELA, hasta el desarrollo de potenciales estrategias terapéuticas en modelos animales, basadas en terapia celular y terapia génica no viral basada en el fragmento C de la toxina tetánica.

Respecto a la Transferencia Tecnológica, es coautora de nueve patentes, la mayoría de ellas licenciadas y participa en numerosos contratos de investigación con empresas. Por otra parte, desde julio de 2012 hasta la actualidad, es directora de Secretariado del Vicerrectorado de Transferencia e Innovación Tecnológica en la Universidad de Zaragoza y miembro del Comité Spin-off. Además, forma parte de varias comisiones de evaluación (entre ellas, es evaluadora de la Agencia Nacional de Evaluación de la Calidad y Acreditación, FIS, Eu-Lac).

**Prof. FÁTIMA BOSCH**

Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica, Universitat Autònoma de Barcelona

Fátima Bosch is a Pharmacist (1980) and PhD in Biochemistry (1985) from the University of Barcelona. She conducted post-doctoral studies at Vanderbilt University (1985), Case Western Reserve University (1988-1990), and NCI-Frederick Cancer Research and Development Centre (1991). She is currently Tenured Professor of Biochemistry and Molecular Biology (1999) and Director of the Centre of Animal Biotechnology and Gene Therapy (2003) at the Autonomous University of Barcelona (UAB). Dr. Bosch has received the Rey Juan Carlos I (1985), Francisco Grande Covián (1998), Narcís Monturiol (2002), Sant Jordi Cross (2005), Alberto Sols (2006) and ICREA Academia (2013) awards. She is a founding member of the European Society of Gene and Cell Therapy (1992), President of the Spanish Society of Gene and Cell Therapy (2007-2009), Vice-President of the European Association for the Study of Diabetes (2009-2012), member of the Scientific Advisory Board of the German Centre for Diabetes Research e.V. (DZD e.V.) (2011-present), member of the Gene Doping Expert Group of the World Anti-Doping Agency (2013-present)

and member of the Advisory Council for Science, Technology and Innovation of the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (2017-2020).

Dr. Bosch's research focuses on studying the pathophysiological causes of diabetes mellitus using transgenic animal models and developing gene therapy approaches to this disease through in vivo genetic manipulation of tissues using viral vectors. In recent years, she has applied her know-how on gene transfer technologies to the development of gene therapies for severe inherited metabolic disorders such as Mucopolysaccharidosis (MPS).

Since 2009, Dr. Bosch has led the UAB public-private partnership activities with pharmaceutical company ESTEVE, established to develop gene therapies for the treatment of MPS. Presently, three gene therapy medicinal products have received the orphan drug designation from the European and North American authorities. The first clinical trial is expected to begin in the first quarter of 2018, with a gene therapy for the treatment of MPSIIIA patients.

**Prof. FÁTIMA BOSCH**

Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica, Universitat Autònoma de Barcelona  
(Barcelona)

Fátima Bosch es licenciada en Farmacia (1980, Premio Extraordinario) y Doctora en Bioquímica (1985) por la Universidad de Barcelona. Realizó estudios posdoctorales en la Universidad de Vanderbilt (1985), en la Case Western Reserve University (1988-1990) y en el NCI-Frederick Cancer Research and Development Center (1991). Actualmente, es Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular (1999) y directora del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (2003) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Ha recibido los premios Rey Juan Carlos I (1985), Francisco Grande Covián (1998), la Medalla Narcís Monturiol (2002), la Cruz de Sant Jordi (2005), el “Alberto Sols” de la Sociedad Española de Diabetes (2006) y el ICREA Academia (2013). Ha sido miembro fundador de la Sociedad Europea de Terapia Genética y Celular (ESGCT) (1992), Presidenta de la Sociedad Española de Terapia Genética y Celular (SETGyC) (2007-2009), Vicepresidenta de la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD) (2009-2012), miembro del Consejo Científico del German Center for Diabetes Research e.V. (DZD e.V.) (2011-actualidad), miembro del Grupo de Expertos en Dopaje Genético de la Agencia Mundial Antidopaje (2013-actualidad) y miembro

del Consejo Asesor de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (2017-2020).

Sus investigaciones están centradas en el estudio de las causas fisiopatológicas de la diabetes mellitus utilizando modelos animales transgénicos y en el desarrollo de aproximaciones de terapia génica para esta enfermedad mediante la manipulación genética *in vivo* de tejidos claves utilizando vectores virales. En los últimos años, también ha aplicado sus conocimientos sobre las tecnologías de transferencia de genes al desarrollo de nuevas terapias génicas para graves trastornos metabólicos hereditarios como las Mucopolisacaridosis (MPS).

Desde 2009 lidera las actividades de la UAB en el partenariado público-privado con la empresa farmacéutica ESTEVE, constituido para desarrollar terapias génicas para el tratamiento de las MPS. En la actualidad, se dispone ya de la designación de tres productos de terapia génica como medicamentos huérfanos por parte de las autoridades europeas y norteamericanas.

# ABOUT LUZÓN FOUNDATION



**The Luzón Foundation Observatory**, an ambitious project aiming to monitor the overall situation regarding the care of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) in Spain, from the aspect of health, of access and development of medicines and treatments, as well as research and innovation.

1



**RevELA Map of Patients and Resources**

*"There is currently no information about those affected by ALS in Spain nor a record of them"*

In 2017, we launched REVELA, in which information was gathered for the first time. The preliminary data was checked with the Autonomous Regions through the Observatory.

**Together we want to keep progressing and obtaining greater knowledge about patients and their needs.**

In 2017, we created LuzMapa, which contains detailed information about the existing resources regarding research into ALS in Spain.

**A useful tool to introduce and connect the scientific community interested in ALS and to contribute decisively to progress.**

2



**LuzMapa:**  
Resources, activities and results of R+D+i in Spain

*"ALS is a rare disease, and its research is not seen as a priority. Existing information about the different research teams engaged in ALS in Spain is very diffuse"*

3



**Resonance:**  
Reports on the disease

*"Resonance is an awareness platform created to address systemic knowledge about ALS, its scale and its different challenges and needs"*

4



**Social Resonance:**  
Reports on the social impact of ALS

*"Social Resonance was created as a platform to meet the exclusive needs of ALS patients, carers and relatives from a social point of view"*

5

**Reports Medicines for ALS**

*"By creating periodic reports, our aim is to generate accurate and updated information on treatment options and available support."*



# SOBRE LA FUNDACIÓN LUZÓN



**Observatorio Fundación Luzón**, un ambicioso proyecto que pretende servir de monitor de la situación global de la atención a la ELA en España, desde su vertiente sanitaria, de acceso y desarrollo de medicamentos y tratamientos, investigación e innovación

1



**RevELA Mapa de Pacientes y Recursos**

*"Actualmente no existe información ni un registro de las personas afectadas por ELA a nivel nacional"*

En 2017 hemos puesto en marcha REVELA, realizando una primera recogida de información. Los datos preliminares han sido contrastados con las CCAA en el marco del Observatorio.

**Juntos queremos seguir avanzando en un mejor conocimiento de pacientes y sus necesidades.**

2



**LuzMapa:**  
Recursos, actividades y resultados de la I+D+i en España

*"La ELA es una enfermedad minoritaria, y su investigación no es prioritaria. La información existente sobre los distintos equipos de investigación que se ocupan de la ELA en España está muy disgregada"*

3



**Resonancia:**  
Informes sobre la enfermedad

*"Resonancia es una plataforma de concienciación que nace para abordar su conocimiento sistémico, las dimensiones de su realidad y sus diferentes retos y necesidades"*

4



**Resonancia Social:**  
Informes sobre el impacto social de la ELA

*"Resonancia Social, surge como Plataforma para cubrir las necesidades exclusivas de los enfermos de ELA, cuidadores y familiares desde un punto de vista social"*

5

**Informes Medicamentos para la ELA**

*"Con la elaboración de informes periódicos pretendemos generar información veraz y actualizada sobre las opciones de tratamiento y soporte disponible"*



**6**

### Research Plan

*"Fostering research into ALS is a priority. Coordinating efforts at state and international level, generating a research critical mass and fostering public-private collaboration are aspects that are crucial to finally discovering a cure."*

#### Talent ALS

In 2017, our event **Talent ALS** was created. With the collaboration of the Foundation of the La Caixa bank and through a 5-year partnership, we aim to help strengthen the ALS scientific community in our country.

#### SCIENTIFIC Forums

In July 2017, we held the **first monographic International Meeting on ALS** in conjunction with the Fundación Ramón Areces, with the aim of becoming a benchmark in connecting ALS researchers in Spain

#### NUTRITIONAL Research



*"There is no systematised scientific study that investigates the nutritional needs of ALS patients"*

For this reason, we are promoting a line of research developed by **Con gusto**, an innovative nutritional guide for those with ALS and Dysphagia



#### TECHNOLOGY FOR ALS

*"We are aware of the value of developments in telemedicine and telecare together with all the technological innovation and artificial intelligence, applied to the communication, personal autonomy and the mobility of ALS patients"*

In 2017, we began to explore remote medical solutions for patients with ALS and neurodegenerative diseases.

**7**

### ESCUELA (AL SCHOOL)

*"A different disease requires different training"*

ESCUELA (AL SCHOOL) is an innovative programme aimed at relatives, carers and professionals from the health and social spheres. It covers all the knowledge, aptitudes and attitudes needed to treat and accompany patients and their relatives in the course of the disease.

**8**

### AL TRANSFORM

*"Comprehensive clinical and social care of patients in coordinated multidisciplinary units is needed"*

In 2017, all the ALS patients' associations in Spain, the Spanish Neurology Society (SEN), the Spanish Pneumology Society (SEPAR), Spain's Conference of University Principals, the Ministry of Health of the Government of Spain, the Carlos III Institute of Health and the 17 Autonomous Regions had formed part of our transformative ALS community. Also last year, we signed 10 collaboration agreements with public and private entities.



### ALS PATIENTS

*"The voice of patients is the driving force behind our activity and our fundamental*

**10**

In 2017, we supported the creation of associations in those regions where they did not exist and we have structured a joint line of action with them all.

#### PSYCOSOCIAL SUPPORT

*"Accompanying patients and their relatives is one of our great concerns and undertakings"*



In 2017, together with La Caixa Social Welfare Foundation, we created **Acompañía**, a programme to reinforce the psychosocial care of patients throughout Spain, with a pilot scheme in 4 Regions



## 6 Plan de Investigación

*"Fomentar la investigación en ELA es prioritario. Coordinar esfuerzos a nivel estatal e internacional, generar masa crítica investigadora y fomentar la colaboración público-privada son aspectos clave para encontrar, por fin, una cura"*

### Talento ELA

En 2017 ha nacido nuestra convocatoria **Talento ELA**. Con la colaboración de Fundación Bancaria "La Caixa" y a través de una alianza de 5 años, pretendemos contribuir al fortalecimiento de la comunidad científica en ELA en nuestro país.

### Foros CIENTÍFICOS

En julio de 2017 celebramos el I Encuentro Internacional monográfico sobre la ELA con la Fundación Ramón Areces, con la vocación de ser referente para la conexión de investigadores ELA en nuestro país

### Investigación NUTRICIONAL

investigación U  
nutricional  
con Gusto

*"No existe un estudio científico sistematizado que investigue las necesidades nutricionales de pacientes con ELA"*

Por esta razón, impulsamos una línea de investigación que ha desarrollado **Con gusto**, una innovadora guía nutricional para personas con ELA y DISFAGIA



## TECNOLOGÍA PARA LA ELA

*"Somos conscientes del valor de los avances en telemedicina, teleasistencia así como toda la innovación tecnológica y la inteligencia artificial, aplicadas a la comunicación, la autonomía personal y la movilidad de los enfermos de ELA"*

En 2017 hemos comenzado a explorar soluciones de medicina no presencial para los pacientes de ELA y de enfermedades neurodegenerativas.



## ESCUELA



*"Una enfermedad distinta necesita una formación distinta"*

ESCUELA es un programa innovador destinado a familiares, cuidadores y profesionales del ámbito sanitario y social, en todos los conocimientos, aptitudes y actitudes necesarios para poder tratar y acompañar a los enfermos y sus familias durante la enfermedad.

## TRANSFORMAELA



*"Es necesaria una atención clínica y social integral de los pacientes en unidades multidisciplinares coordinadas"*

En 2017 todas las Asociaciones de pacientes de ELA en España, la Sociedad Española de Neurología, (SEN), la Sociedad Española de Neumología (SEPAR), la Conferencia de Rectores Universitarios Españoles, el Ministerio de Sanidad del Gobierno de España, el Instituto de Salud Carlos III y las 17 CCAA forman ya parte de nuestra Comunidad transformadora de la ELA. Además en este año hemos firmado 10 convenios de colaboración con entidades públicas y privadas.



## PACIENTES ELA



*"La voz de los pacientes es el motor de nuestra actividad y nuestra inspiración fundamental"*

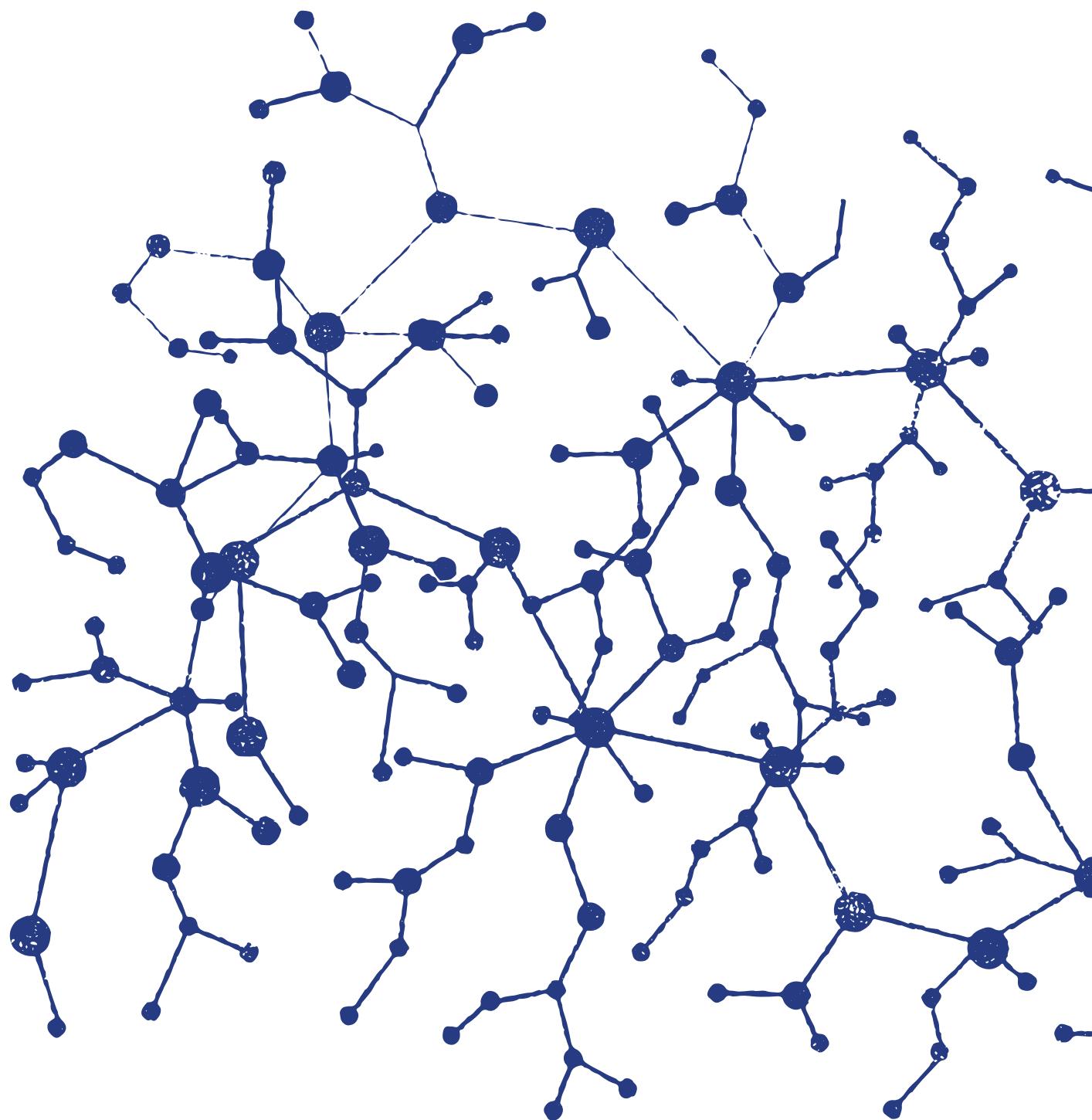
En 2017 hemos apoyado la creación de Asociaciones en aquellas regiones donde no las había y hemos vertebrado una línea de acción conjunta con todas ellas



## APOYO PSICOSOCIAL

*"El acompañamiento a los enfermos y a sus familias es una de nuestras grandes preocupaciones y ocupaciones"*

En 2017, junto con Fundación Obra Social La Caixa, ha nacido **Acompaña**, un programa para reforzar la asistencia psicosocial de los enfermos en toda España, con un primer piloto en 4 CCAA.



FUNDACIÓN  
RAMÓN ARECES

Vitruvio, 5 – 28006 Madrid  
[www.fundacionareces.es](http://www.fundacionareces.es)  
[www.fundacionareces.tv](http://www.fundacionareces.tv)