

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA SAN VICENTE  
MÁRTIR

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud  
Departamento de Enfermería



**Calidad ósea y alteraciones  
electrocardiográficas de pacientes con  
Esclerosis Lateral Amiotrófica e impacto a  
nivel motor de una intervención con  
antioxidantes**

**TESIS DOCTORAL**

PRESENTADA POR

D. Jordi Caplliure Llopis

DIRIGIDA POR:

Dra. Dña. María Benlloch García

**2021**

A mis hijas Candela y Carmen.



# Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a Carlos Barrios su confianza puesta en mí, ya que, fue él quien me inició en el apasionante mundo de la investigación, inculcándome sus valores y perfección, y enseñándome a ser paciente. Eres todo un referente para mí, gracias por todo.

En segundo lugar, y no menos importante, a mi directora, María Benlloch, por su paciencia y vocación docente, demostrándome todo su cariño y comprensión, además de, su completa disponibilidad. Y, a José Enrique de la Rubia, quién me ha hecho sentir uno más de su equipo. Mencionar también a Sandra Sancho por todo su apoyo y gran ayuda.

A la fundación FUNDELA, sin su buen hacer, no hubiese sido posible este trabajo de investigación.

A mi madre, quién ha inculcado en mí sus valores, haciéndome ser mejor persona. A pesar de todos los contratiempos y vueltas que da la vida, nunca tiró la toalla y siempre confió en mí. Nunca jamás pensé que pudiese llegar a ser doctor, sin embargo, mi madre hace años que lo sabe.

También me gustaría nombrar a M<sup>a</sup> Sales Matoses, mi madrina profesional. Sin sus sabios consejos y su confianza, no hubiese llegado a ser enfermero.

Por otro lado, me gustaría pedir perdón a mi esposa Eugenia y mis hijas Candela y Carmen. Perdón por no haber pasado más tiempo con ellas, dedicándoselo a la tesis o a la investigación. Sois lo más importante que tengo en esta vida, y todo lo que he hecho, hago y haré es por vosotras, espero no defraudaros nunca ni como esposo ni como padre. Y al mismo tiempo, darles las gracias por tanto amor recibido, por tanta comprensión, por tanta y tanta paciencia y por demostrarme todos los días, el amor que sois capaces de dar. En definitiva, os amo.



## Resumen

---

**Marco teórico.** La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad considerada rara y devastadora, caracterizada por pérdida de neuronas motoras, generando atrofia muscular. Se distinguen dos tipos principalmente de ELA: bulbar y medular. Ambos tipos debutan con signos y síntomas característicos que reflejan una progresión del deterioro musculoesquelético. Este deterioro se asocia con un aumento de fracturas óseas al verse mermada la densidad mineral ósea a causa del daño musculoesquelético. Además, algunas de las características de la enfermedad de ELA son los trastornos relacionados con el sistema nervioso autónomo, la pérdida de los nervios noradrenérgicos simpáticos cardiacos, denervación noradrenérgica extracardíaca y por último la insuficiencia arterial que incluye mecanismos implicados en la regulación de la presión arterial, frecuencia cardíaca y otras funciones homeostáticas. Finalmente, se trata de una enfermedad cuya cura es desconocida y los beneficios de los tratamientos existentes siguen sin mostrar un claro retroceso de la enfermedad. Por ello, es importante entender la morbilidad de esta enfermedad entendiéndola que se trata de un trastorno que requiere un abordaje multidisciplinar.

**Objetivos.** Determinar la calidad ósea y las alteraciones electrocardiográficas; y evaluar el tratamiento con Elysium Health ' EH301 (antioxidante) mediante electromiografía en pacientes afectados por ELA.

**Material y métodos.** La presente tesis doctoral muestra tres estudios realizados en pacientes con ELA: el *estudio 1* es un análisis descriptivo donde se analizó la calidad ósea de pacientes de ELA (33 pacientes) frente a una población sana (66 personas) mediante la técnica ultrasonidos (QUS). La densidad mineral ósea (DMO) se estimó comparando entre ambas poblaciones y determinando su correlación. El *estudio 2* consta de otro análisis descriptivo, donde analizó el estado electrocardiográfico a 30 pacientes con ELA y un grupo control de 30 voluntarios sanos mediante electrocardiografía, con el propósito de describir posibles alteraciones electrocardiográficas en estos pacientes. El *estudio 3*, es un estudio experimental donde 32 pacientes con ELA fueron asignados al azar para recibir ya sea EH301, una combinación de pterostilbeno y nicotinamida ribósido o placebo, realizando evaluaciones durante cuatro meses. Las diferencias entre EH301 y el grupo control tratados con placebo fueron analizadas en base a criterios de valoración clínicos estándar, incluyendo la escala revisada ALS funcional del grado (ALSFRS-R), la capacidad vital forzada (FVC), la escala de clasificación del Medical Research Council (MRC) y electromiografía.

**Resultados.** En el *estudio 1*, todos los parámetros óseos evaluados fueron significativamente más bajos en pacientes con ELA que en las personas de control sanas. Dentro del grupo de ELA destacan los bajos parámetros de las mujeres. Por lo que respecta al *estudio 2*, todas las mediciones de ondas y segmentos del grupo

ELA fueron menores que el grupo control, excepto el intervalo PQ y la frecuencia cardíaca, no siendo

significativa esta diferencia. Por otro lado, en el grupo ELA obtuvo una diferencia significativamente mayor en alteraciones de la repolarización en el grupo ELA. Finalmente, en el *estudio 3* tras la intervención se concluyó que los participantes del grupo EH301 mostraron mejoras significativas en ALSFRS-R, FEV %, fuerza muscular y relación peso músculo/grasa. Además, se demostró que EH301 ralentiza significativamente la progresión de la ELA en relación con el placebo, e incluso mostró mejoras en varias medidas de resultado clave en comparación con la línea de base.

**Conclusiones.** Tras analizar y discutir todos los resultados, se llegó a la conclusión de que los pacientes con ELA tenían peor calidad ósea respecto a una población control sana con rango de edad similar. Por lo que respecta al estudio electrocardiográfico, no se hallaron diferencias en cuanto a la métrica, pero sí en cuanto a hallazgos de alteraciones en la repolarización, siendo ésta estadísticamente superior en el grupo ELA (56,7%) frente al grupo control (0%). Finalmente, la intervención con EH301, mejoró la función muscular a los 4 meses frente al grupo placebo.

**Palabras clave:** Esclerosis lateral amiotrófica, calidad ósea, ultrasonografía cuantitativa (QUS), densidad mineral ósea, electrocardiografía, antioxidantes, NAD<sup>+</sup>

## Abstract

---

**Background.** Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rare and devastating disease, characterized by loss of motor neurons, which generates muscle atrophy. There are two main types of ALS: bulbar and medullar. Both types debut with characteristic signs and symptoms that reflect a progressive musculoskeletal impairment. This deterioration is associated with an increase in bone fractures as bone mineral density is reduced due to musculoskeletal damage. Besides, some characteristics of ALS are disorders related to the autonomic nervous system, loss of cardiac sympathetic noradrenergic nerves, extracardiac noradrenergic denervation and finally arterial failure that includes mechanisms involved in regulating blood pressure, heart rate and other homeostatic functions. Finally, it is a disease with an unknown cure. The benefits of the existing treatments still do not show clear improvement for the patients. Therefore, it is important to understand the morbidity of this disease understanding that it is a multidisciplinary condition.

**Objective.** Determine bone quality and record cardioelectric activity alterations and evaluate the efficacy and tolerability of treatment with Elysium Health EH301 (antioxidant) by electromyography.

**Methods.** This doctoral thesis includes three studies in patients with ALS: in the first study is a descriptive analysis where it was studied, the bone quality of ALS patients (33 patients) against healthy population (66 people) using quantitative ultrasound (QUS) of the calcaneus. Bone mineral density (BMD) was estimated by standard equations. Bone quality in patients with ALS was compared to that of healthy controls. The second study is a descriptive one as well where the cardiac activity of 30 patients with ALS and a control group of 30 healthy volunteers were analysed by electrocardiography, to describe possible electrocardiographic alterations. The third study was an experimental one where 32 patients of ALS were randomly assigned to receive either EH301, a combination of nicotinamide riboside with pterostilbene, or with placebo, conducting evaluations over four months. Differences between EH301 and the placebo-treated control group were analysed based on standard clinical assessment criteria, including the revised ALS functional rating scale (ALS-FRS), forced vital capacity (FVC), Medical Research Council (MRC) scale, and electromyography.

**Results.** In the first study, all tested bones parameters were statistically significantly lower in patients with ALS than in the healthy control group. ALS females showed significantly lower bone parameters than healthy females. Regarding to the study number 2, all measurements of waves and segments in the ALS group were less than the ones in the control group, except the PQ interval and heart rate, which difference is not significant. On the other hand, in the ALS group alterations of repolarization made a significantly greater difference in patients.

Finally, in the third study, after intervention, it was concluded that participants in the EH301 group showed significant improvements

in ALS-FRS, FVC percentage, muscle strength and muscle to fat ratio. Also, EH301 was shown to significantly slow down the progression of ALS compared to the placebo, and even showed improvements in several key outcome measures compared to the baseline.

**Conclusion.** After analysing and discussing all the results, it was concluded that patients with ALS had worse bone quality as measured by QUS compared to the healthy control population with a similar age range. Regarding the electrocardiographic study, no differences in waves metrics were found between the two populations, but ALS patients showed statistically significant more frequent alterations of repolarization than in the control group (56.7% vs 0%). Finally, intervention with EH301 improved muscle function within 4 months in ALS patients compared to the placebo group.

**Keywords:** amyotrophic lateral sclerosis, bone quality, quantitative ultrasound (QUS) measurement, bone mineral density, electrocardiography, antioxidants, NAD<sup>+</sup>

# Índice

1	Introducción y justificación del estudio. ....	3
1.1	Marco teórico.....	5
1.2	Sistema Nervioso.....	5
1.3	Esclerosis Lateral Amiotrófica. ....	11
❖	Signos y síntomas .....	13
❖	Epidemiología de ELA .....	16
❖	Diagnóstico.....	18
➤	Pruebas diagnósticas.....	20
1.4	Sistema musculoesquelético. Posible relación con la enfermedad de ELA. ...	22
1.4.1	Osteoporosis. ....	27
1.4.2	ELA y calidad ósea.....	33
1.5	Sistema Nervioso Cardíaco. Posible relación con la enfermedad de ELA.....	35
1.5.1	Valoración cardíaca mediante electrocardiograma.....	45
1.5.2	Afectación cardíaca y ELA.....	47
1.6	Causas etiopatogénicas de ELA. ....	48
❖	Mecanismo molecular. ....	51
➤	Excitotoxicidad del glutamato.....	52
➤	Alteraciones estructurales y funcionales de las mitocondrias. ....	54
➤	Radicales de estrés oxidativo.....	55
➤	Polifenoles. ....	58
1.7	Efecto en ELA de una intervención con pterostilbeno y nicotinamida ribósido. 61	
1.7.1	Pterostilbeno. ....	61
1.7.2	Nicotinamida ribósido. ....	62
2	Hipótesis y objetivos. ....	67
2.1	Hipótesis.....	67
2.2	Objetivos principales y secundarios. ....	67
3	Material y métodos.....	73
❖	Diseño del estudio. ....	73
❖	Variables determinadas para los 3 estudios.....	74
➤	ALSFR-R (Revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale). ....	74
➤	Índice Barthel. ....	75
➤	FEV (volumen espirado forzado). ....	75
➤	MRC (Medical Research Council). ....	75
➤	Antropometría.....	76

3.1	Estudio 1. Valoración de la calidad ósea. Densitómetro de calcáneo. ....	78
❖	Diseño del estudio. ....	78
❖	Participantes. ....	78
❖	Tamaño muestral ....	79
❖	Metodología para la determinación de la calidad ósea.....	80
❖	Análisis estadístico. ....	87
3.2	Estudio 2. Valoración de la actividad cardíaca. Electrocardiograma.....	88
❖	Diseño del estudio. ....	88
❖	Participantes. ....	88
❖	Tamaño muestral. ....	89
❖	Metodología para la realización de los electrocardiogramas.....	90
❖	Análisis estadístico. ....	94
3.3	Estudio 3: Valoración electromiográfica de una intervención con EH301. ...	95
❖	Diseño del estudio. ....	95
❖	Participantes. ....	96
❖	Tamaño muestral ....	98
❖	Metodología para la determinación de electromiografía.....	98
❖	Análisis estadístico. ....	102
4	Resultados .....	107
4.1	Resultados estudio 1. Valoración de la calidad ósea. Densitómetro de calcáneo.....	107
4.2	Resultados estudio 2. Valoración de la actividad cardíaca. Electrocardiograma. ....	115
4.3	Resultados estudio 3. Valoración electromiográfica de una intervención con EH301.120	
5	Discusión.....	129
5.1	Discusión estudio 1. Valoración de la calidad ósea. Densitómetro de calcáneo. 129	
5.2	Discusión estudio 2. Valoración de la actividad cardíaca. Electrocardiograma. 133	
5.3	Discusión estudio 3. Valoración electromiográfica de una intervención con antioxidantes. ....	137
6	Conclusiones .....	143
7	Bibliografía .....	149
8	Anexos.....	169
9	Publicaciones en revistas internacionales. ....	187
9.1	Publicación 1. ....	187
9.2	Publicación 2. ....	200

9.3	Publicación 3. ....	208
10	Capítulos de libro en congresos.....	221
10.1	Capítulo de libro 1. ....	221
10.2	Capítulo de libro 2. ....	222
10.3	Capítulo de libro 3. ....	223
11	Comunicaciones en congresos.....	227
11.1	Comunicación 1.....	227



## **Índice de tablas**

---

Tabla I. Clasificación neuroanatómica de las enfermedades neuromusculares.....	10
Tabla II. Signos y síntomas de la enfermedad según disfunción del tipo de neurona....	14
Tabla III. Clasificación de la osteoporosis según la OMS. ....	28
Tabla IV. Factores de riesgo de la osteoporosis .....	29
Tabla V. Factores de riesgo de fractura incluidos en el FRAX.....	30
Tabla VI. Resumen de valores normales de un electrocardiograma. ....	93
Tabla VII. Edad y características antropométricas generales de grupo control y grupo ELA, discriminados por sexo. ....	108
Tabla VIII. Parámetros óseos de grupo control y grupo ELA mediante QUS.....	110
Tabla IX. Perfiles clínicos y parámetros de laboratorio del grupo ELA. ....	112
Tabla X. Características clínicas, de laboratorio y óseas del subtipo de ELA. ....	114
Tabla XI. Características de la población a estudio.....	115
Tabla XII. Variables métricas de los ECG's. ....	116
Tabla XIII. Alteraciones electrocardiográficas morfológicas. ....	119
Tabla XIV. Características iniciales y cambio en las medidas de resultado después de 2 meses (2 M) y 4 meses (4 M) de tratamiento con ya sea placebo o EH301.....	121



## Índice de figuras

---

Figura 1. Sinapsis. Comunicación de la neurona bien sea con otra neurona o con células receptoras. Elaboración propia. ....	5
Figura 2. Despolarización de la membrana de la neurona. Elaboración propia. ....	6
Figura 3. Esquema neurona motora. Fuente: modificado de School of biology sob. UK England. ....	7
Figura 4. Áreas de Brodmann. Son 47 regiones imaginarias que conforman el mapa del SNC. Modificado de Cuaderno de Neurofisiología 2017.1. Rubens do Amaral. ....	8
Figura 5. Distintos personajes públicos que han padecido ELA. <b>1:</b> Dimitri Shostakovic. <b>2:</b> Mao Tse-Tung. <b>3:</b> Stephen Hawking. <b>4:</b> Lou Gehrig. ....	12
Figura 6. Signo Hoffmann. Se flexiona falange distal y se observa si hay movilidad o no del dedo pulgar. Modificado de Evaluación del movimiento en flexoextensión, flexiones laterales y rotación axial. ....	15
Figura 7. Ejemplo de Cícada. Fuente: <a href="http://garciaspalms.com/palm-trees.html">http://garciaspalms.com/palm-trees.html</a> . ....	18
Figura 8. Tipos de células óseas. Elaboración propia. ....	23
Figura 9. Técnica DXA. Fuente: <a href="https://www.richet.com.br/medicos/blog/avaliacao-da-composicao-corporal-por-densitometria/">https://www.richet.com.br/medicos/blog/avaliacao-da-composicao-corporal-por-densitometria/</a> . ....	31
Figura 10. Rama eferente, regulación neuronal cardiovascular. Elaboración propia. ....	36
Figura 11. Rutas de las ramas eferentes simpática y parasimpática. Elaboración propia. ....	38
Figura 12. Inervación de los nervios simpáticos y parasimpáticos en el corazón. Modificado de Tratado de Fisiología Médica, Guyton & Hall; 2001. ....	39
Figura 13. Vías aferentes y eferentes. Regulación neural cardiovascular. Elaboración propia. ....	41
Figura 14. Efecto de los diferentes grados de estimulación simpática y parasimpática sobre la curva de gasto cardíaco. Fuente: Tratado de Fisiología Médica, Guyton & Hall; 2001. ....	42
Figura 15. Ondas, segmentos e intervalos de un latido cardíaco sobre electrocardiografía en papel milimetrado. Elaboración propia. ....	46
Figura 16. Ondas, segmentos e intervalos en un ECG sinusal y su significado. Elaboración propia. ....	47
Figura 17. Procesos celulares y moleculares que median la neurodegeneración en ELA. Modificado de Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet. 2011 Mar 12;377(9769):942-55. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61156-7. ....	52
Figura 18. Esquema de la sinapsis. Modificado de Arias HR. Marine Toxins Targeting Ion Channels. Mar Drugs. 2006;4(3):37-69. Published 2006 Apr 6. ....	53
Figura 19. Daño mitocondrial en ELA. Elaboración propia. ....	54
Figura 20. Clasificación de los principales polifenoles. Elaboración propia. ....	59
Figura 21. Estructura química pterostilbeno. Fuente: elaboración propia. ....	62

Figura 22. Estructura química de nicotinamida ribósido. Fuente: elaboración propia...	62
Figura 23. Plicómetro, Pie de Rey, Cinta métrica. Fuente: Tesis Vicente Lizondo.....	76
Figura 24. Grosor de los pliegues cutáneos. Fuente: Tesis Vicente Lizondo.....	77
Figura 25. Perímetros de brazo, muslo y pierna (cm). Fuente: Tesis Vicente Lizondo.	77
Figura 26. Diámetros biestiloideo e intercondíleos de humero y fémur distal (mm). Fuente: Tesis Vicente Lizondo. ....	77
Figura 27. Población incluida en el estudio de calidad ósea. ....	79
Figura 28. Fórmula para calcular tamaño muestral. <a href="https://www.imim.es/ofertadeserveis/software-public/granmo/">https://www.imim.es/ofertadeserveis/software-public/granmo/</a> .....	80
Figura 29. Densitómetro de calcáneo Achilles Insight, GE. Utilizado en el estudio. ....	81
Figura 30. Mediciones que realiza Achilles Insight GE. Elaboración propia. ....	82
Figura 31. Hoja de recogida de datos de afiliación (software).....	83
Figura 32. Posición del paciente. Elaboración propia. ....	83
Figura 33. Zonas de aplicación del alcohol 70°. Elaboración propia. ....	84
Figura 34. Aplicación del alcohol en las membranas del densitómetro. Elaboración propia.....	84
Figura 35. Ajuste posicionar dedos. Elaboración propia.....	85
Figura 36. PDF resultado medición sujeto. Fuente: software.....	86
Figura 37. Población incluida en el estudio electrocardiográfico. ....	89
Figura 38. Electrocardiógrafo MAC 1200 GE. Utilizado en el estudio. ....	90
Figura 39. Diagrama de flujo. Población incluida en el estudio de intervención.....	97
Figura 40. Dos señales EMG producido por la contracción del bíceps. La escala de tiempo es de 500ms por recuadro. ....	99
Figura 41. FREE-EMG 300 (8 CANALES).....	100
Figura 42. Ondas de EMG.....	102
Figura 43. Diagrama de cajas, valores métricos medios de los electrocardiogramas. .	117
Figura 44. Principales criterios de valoración clínicos de los grupos a estudio. ....	122
Figura 45. Principales criterios de valoración clínicos de los pacientes a estudio. ....	123
Figura 46. Cambios en la electromiografía (EMG) graficados por músculo (bíceps, tríceps, cuádriceps, tibial).....	124

## Abreviaturas y acrónimos

---

Ach	Acetilcolina
AGCL	Ácidos Grasos de Cadena Larga
AGCM	Ácidos Grasos de Cadena Media
Al <sup>3+</sup>	Aluminio
ALP	Fosfatasa alcalina
AME	Atrofia Muscular Espinal
AMP	Atrofia Muscular Progresiva
AMPK	Proteína Quinasa Activada
As	Arsénico
ATP	Trifosfato de adenosina
AV	Auriculoventricular
BAIBA	Ácido $\beta$ -aminoisobutírico
BMAA	$\beta$ -metilamino-L-alanina
BRD	Bloqueo de Rama Derecha
BUA	Atenuación de la Amplitud de Onda
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CAT	Catalasas
Cd <sup>2+</sup>	Cadmio
Co <sup>3+</sup>	Cobalto
Cu <sup>+</sup>	Cobre
DBP	Vitamin D Binding Protein
DFT	Demencia Frontotemporal
DMO	Densidad Mineral Ósea
DXA	Absorciometría de rayo X de Energía Dual
EAATs	Transportadores de Aminoácidos Excitatorios
EA	Efectos adversos
ECG	Electrocardiograma
EGCG	epilocatequina-3-galato
EK	Enfermedad de Kennedy
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
ELAc	Esclerosis Lateral Amiotrófica Esporádica
ELAf	Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar
ELP	Esclerosis Lateral Primaria
EMG	Electromiografía

EMN	Enfermedad de la motoneurona
EP	Enfermedad de Parkinson
FALS	Esclerosis Lateral Amiotrófica Familiar
Fe <sup>2+</sup>	Hierro
FEV%	Volumen espiratorio forzado
FGF-2	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FVC	Capacidad vital forzada
GPC	Guía de Práctica Clínica
GPx	Glutación Peroxidasa
GSH	Glutación
GSR	Glutación Reductasa
HVD	Hipertrofia Ventricular Derecha
I-Stiffness	Índice de Calidad Ósea
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
IGF-1	Factor de Crecimiento similar a la Insulina
K <sup>+</sup>	Potasio
KB	Cuerpos cetónicos en sangre
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
min	Minutos
MN	Motoneurona
Mn <sup>2+</sup>	Manganeso
MMNN	Motoneuronas
MNI	Motoneurona Inferior
MNS	Motoneurona Superior
MRC	Escala de clasificación del Consejo de Investigación Médica
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
MSC	Células Madre Mesenquimales de la Médula Ósea
Na <sup>+</sup>	Sodio
NAD <sup>+</sup>	Nicotamida Adenina Dinucleótido
NADP <sup>+</sup>	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
P	Fósforo
Pb <sup>2+</sup>	Plomo
PBP	Parálisis bulbar progresiva
PCR	Proteína C Reactiva
PF	Fasciculaciones

PTER	Pterostilbeno
PTH	Hormona Paratiroidea
QUS	Ultrasonografía Cuantitativa
RANKL	Activador del Receptor del Ligando NF-kappa B
REDOX	Reducción-Oxidación
RESV	Resveratrol
RL	Radicales Libres
RM	Resonancia magnética
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
s	Segundos
SA	Sinoauricular
SCV	Sistema Cardiovascular
SFB	Síndrome de Fasciculación Benigna
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNS	Sistema Nervioso Simpático
SOD1	Superóxido dismutasa 1
SOS	Velocidad de Transmisión
SPP	Síndrome post-polio
TAC	Tomografía Axial Computarizada
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante beta
U	Uranio
UVB	Ultravioleta
V <sup>2+</sup>	Vanadio
Vit. D	Vitamina D
VDR	Receptor vitamina D
Zn <sup>2+</sup>	Zinc
SA	Sinoauricular
SCV	Sistema Cardiovascular
SFB	Síndrome de Fasciculación Benigna
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNS	Sistema Nervioso Simpático

SOD1	Superóxido dismutasa 1
SOS	Velocidad de Transmisión
SPP	Síndrome post-polio
TAC	Tomografía Axial Computarizada
U	Uranio
UVB	Ultravioleta
V <sup>2+</sup>	Vanadio
Vit. D	Vitamina D
Zn <sup>2+</sup>	Zinc
μV	microvoltios



1

**Introducción y  
justificación del estudio.  
Marco teórico.**



# **1 Introducción y justificación del estudio.**

---

Las neuronas son las células encargadas de transmitir información a través de señales químicas y eléctricas, requiriendo para ello una gran demanda de energía a nivel cerebral. Este gasto energético representa entre el 20 y el 25% del total de oxígeno consumido por el cuerpo, del cual aproximadamente la mitad se utiliza para generar los potenciales de membrana, siendo a su vez el mantenimiento de los gradientes de iones para la neurotransmisión, la fuente principal de este porcentaje<sup>1</sup>.

En este sentido, la fuente esencial de energía para las neuronas, en forma de trifosfato de adenosina (ATP), obtenido principalmente a partir del catabolismo de la glucosa. Cabe destacar que la glucosa es diez veces más utilizada por la materia gris cerebral que por el resto del cuerpo, existiendo a su vez variaciones de consumo en diferentes regiones cerebrales.

Es por ello que, en el caso de que se produzca una alteración energética de las neuronas, que haya gran susceptibilidad a la neurodegeneración y que se pueda desencadenar gran diversidad de enfermedades neurodegenerativas en función de la región en la que ocurre ese consumo alterado de glucosa<sup>2</sup>. En cualquier caso y sea cual sea la enfermedad resultante, la explicación básica es la disfunción del metabolismo glucídico a nivel cerebral. Éste produce un desequilibrio estructural y funcional de la parte del cerebro afectado, teniendo como base la disfunción mitocondrial. Ello hace que acabe influyendo a nivel global, pudiendo agravar otras alteraciones ya existentes que en esencia son la causa real de enfermedades como Alzheimer, Parkinson<sup>3</sup> o epilepsia<sup>4</sup>.

Las causas etiológicas de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) que se aceptan en la actualidad son la pérdida de control oxidativo, la generación excesiva de radicales libres oxidativos, la acumulación de neurofilamentos y la excitotoxicidad vinculada a un incremento del neurotransmisor glutamato, produciéndose la disfunción de la membrana mitocondrial que dará lugar, finalmente, a una alteración en el balance energético ligada a una menor actividad de las enzimas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en la médula espinal. Esto sugiere que la mejora de la función mitocondrial puede representar un enfoque terapéutico para ELA<sup>5,6</sup>.

Atendiendo a la naturaleza de la enfermedad de ELA donde se produce degeneración neuronal, así como cambios relacionados con el correcto funcionamiento óseo

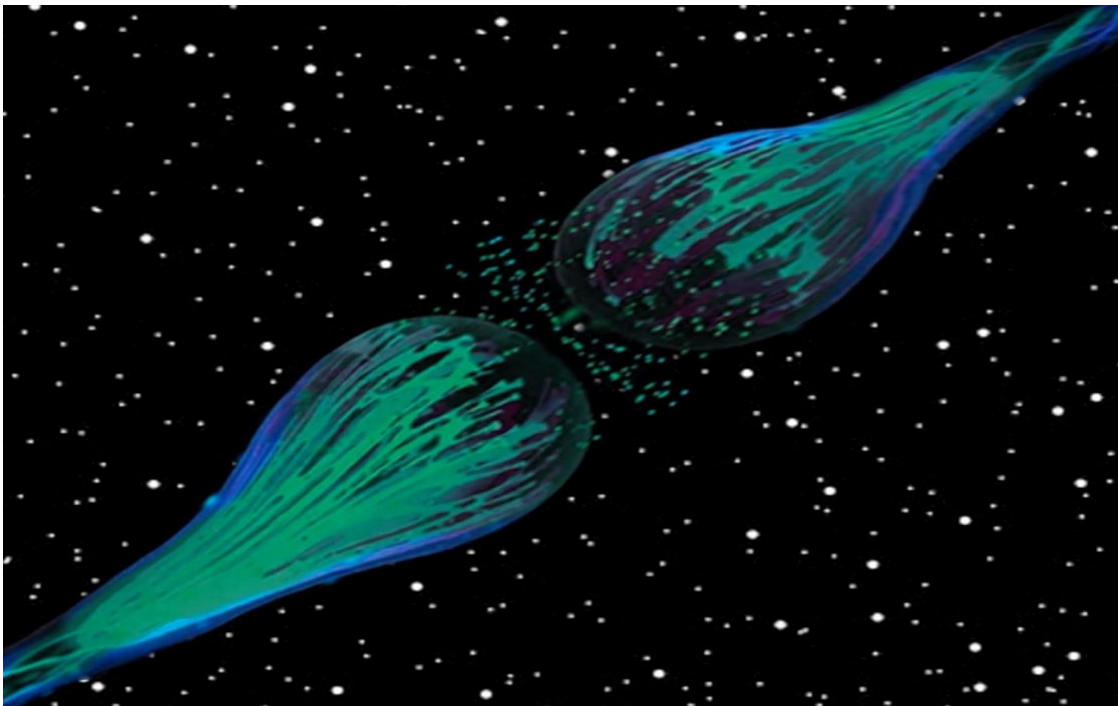
probablemente debido a una atrofia muscular, es necesario estudiar las posibles características de los enfermos de ELA para poder llevar a cabo una intervención más efectiva. Por ello se realizó un estudio descriptivo donde se analizaron las modificaciones densitométricas óseas<sup>7</sup> así como las alteraciones de la actividad cardíaca como posibles características de ELA; y a continuación se valoraron cambios a nivel motor, tras la administración de dos antioxidantes seleccionados por su eficacia en los diferentes modelos de la enfermedad.

## 1.1 **Marco teórico.**

En este primer apartado de la tesis se describen los conocimientos actuales del tema a tratar, empezando por explicar brevemente el sistema nervioso (SN), a continuación se profundiza en la enfermedad de ELA, describiendo tras ello la relación de esta enfermedad con el sistema musculoesquelético y el sistema cardíaco, para acabar valorando las perspectivas y posibles beneficios desde el punto de vista teórico que podría tener la intervención con antioxidantes, y concretamente la combinación de pterostilbeno (pter) y nicotinamida ribósido en una población de pacientes con ELA.

## 1.2 **Sistema Nervioso.**

De las estructuras conocidas, el SN es el más complejo. En la madurez de un cerebro humano puede haber 100.000 millones de neuronas, miles de millones de axones y otros tantos de dendritas, además de 10 millones de conexiones (sinapsis) entre las neuronas (figura 1).



*Figura 1. Sinapsis. Comunicación de la neurona bien sea con otra neurona o con células receptoras. Elaboración propia.*

El potencial de acción de las neuronas responsables de la conducción de los impulsos, se genera mediante el cambio producido en canales iónicos. Estos canales iónicos se

comportan como compuertas, pudiendo permanecer abiertos o cerrados a la conducción de iones (figura 2).

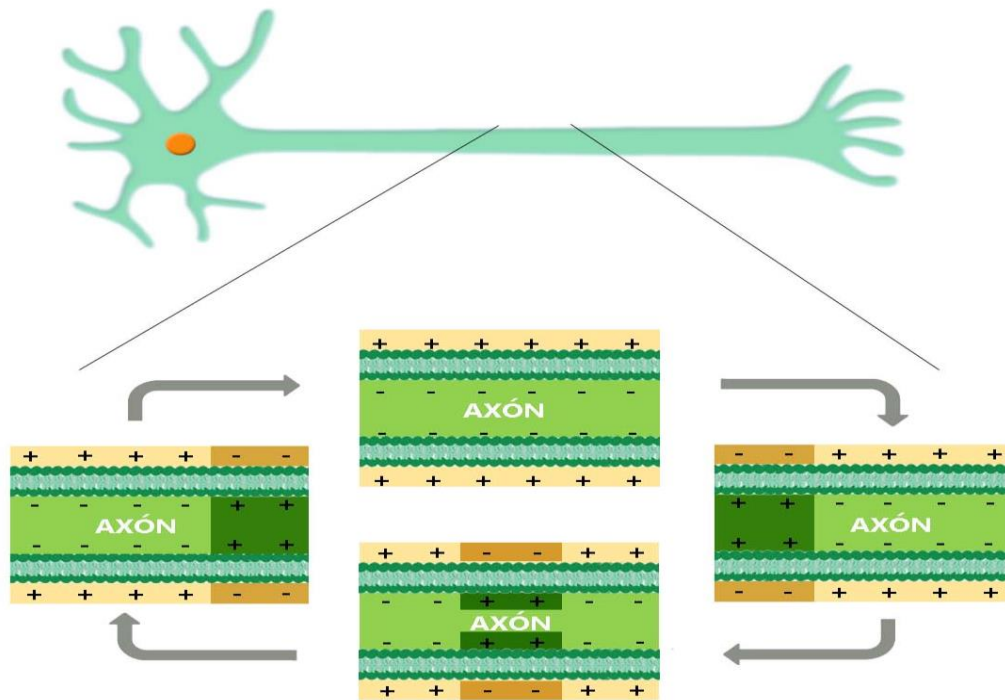


Figura 2. Despolarización de la membrana de la neurona. Elaboración propia.

Hay enfermedades neurológicas humanas que son el resultante de las mutaciones de los genes cuyas proteínas forman los canales iónicos, como por ejemplo en la epilepsia, que se caracteriza por la presencia de descargas repetidas y sincrónicas de los potenciales de acción neuronales (también llamados impulso eléctrico). Dicho impulso es una onda de descarga eléctrica que viaja a lo largo de la membrana celular modificando su distribución de carga eléctrica. Estos impulsos son generados mediante la apertura de los canales de sodio, dejando pasar estos iones a favor gradiente electroquímico.

Los genes que contienen la información para la traducción y formación de las subunidades de los canales del sodio y del potasio se han considerado durante tiempo los causantes de algunas de las enfermedades, aumentando la excitabilidad.

El cuerpo humano tiene más de 300 parejas de músculos bilaterales, y estos poseen más de 100 millones de fibras musculares, que sólo en médula espinal son inervadas por más de 120.000 motoneuronas (MN)<sup>8</sup> (figura 3).

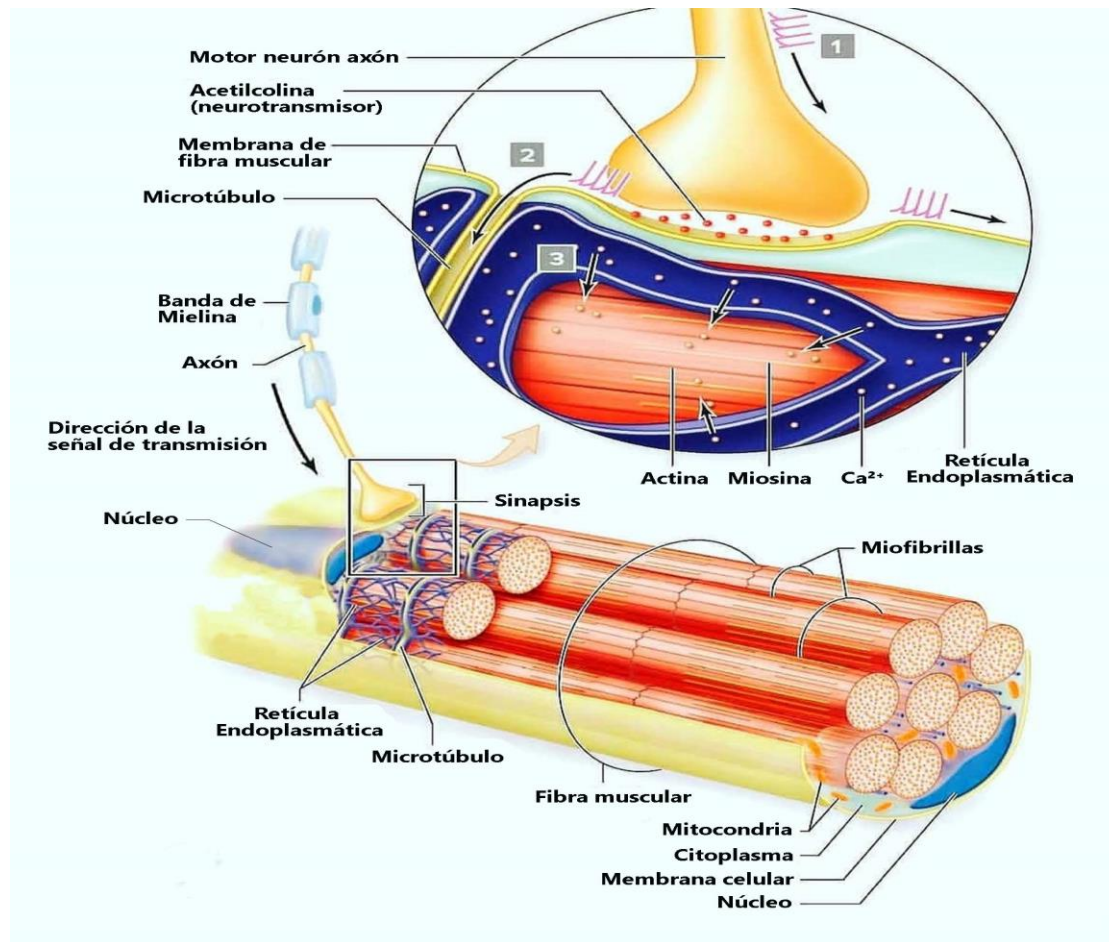


Figura 3. Esquema neurona motora. Fuente: modificado de School of biology sob. UK England.

La principal función de las MN es el control muscular, aunque no pueden relajarlo, sólo contraerlo. La relajación muscular ocurre cuando cesa el impulso o se inhibe la MN. Éstas son las neuronas encargadas de transmitir los impulsos nerviosos desde el Sistema Nervioso Central (SNC) a los diferentes músculos del cuerpo para que se contraigan o se relajen, como por ejemplo el control de diferentes funciones como son respirar, masticar o realizar movimientos más o menos complejos.

El cuerpo de la MN se sitúa en contacto con el SNC y su axón se proyecta hacia el sistema nervioso periférico (SNP), realizando la sinapsis con el tejido muscular. Por lo tanto, las motoneuronas son neuronas eferentes que envían información desde el SNC hacia los músculos esqueléticos, la musculatura lisa de glándulas y órganos.

Uno de los principales puntos de partida del sistema motor humano, es la llamada área de Broadman 4 (figura 4), la cual es considerada como el córtex motor primario o M1, situada en el lóbulo frontal y parte del parietal, zona desde la que parten las motoneuronas superiores (MNS) o células corticoespinales.

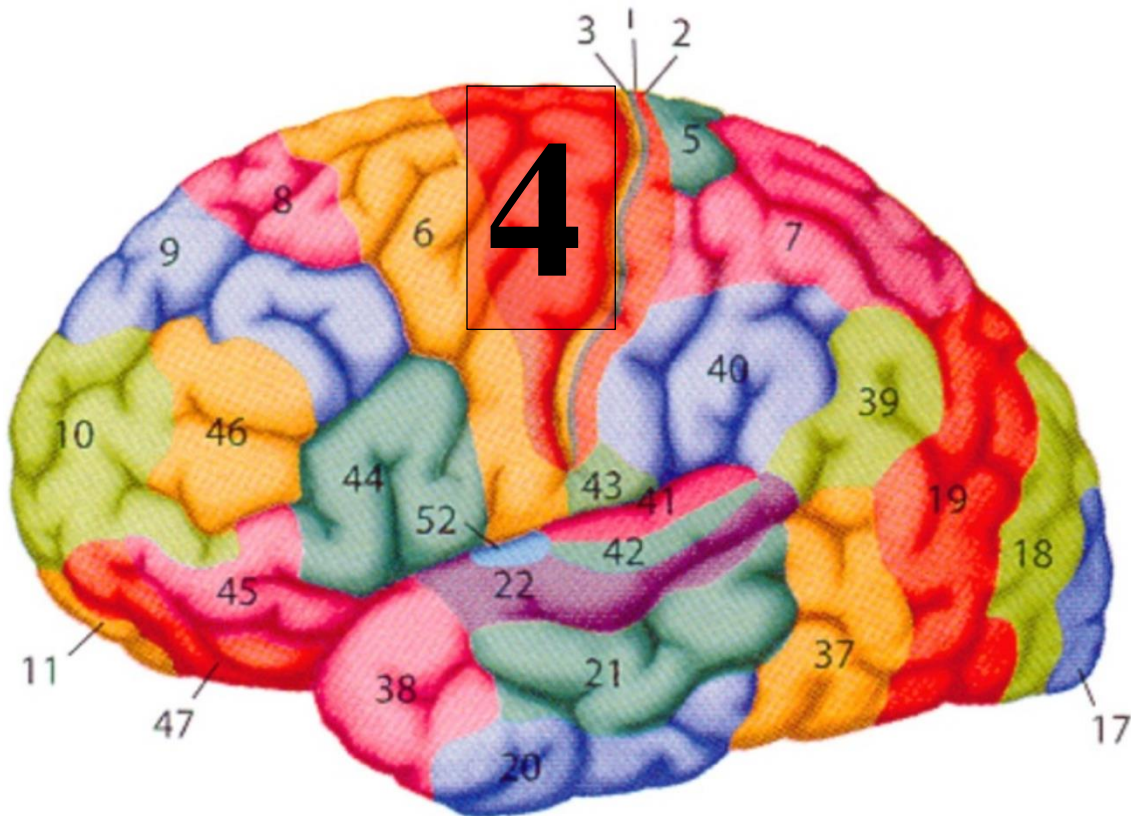


Figura 4. Áreas de Brodmann. Son 47 regiones imaginarias que conforman el mapa del SNC. Modificado de Cuaderno de Neurofisiología 2017.1. Rubens do Amaral.

Las MMNN puede clasificarse en función del tejido que inervan:

1. Motoneuronas somáticas:

Según su posición en el SNC se clasifican en:

- a. Motoneurona Superior (MNS): cuerpo celular se encuentra en la corteza cerebral y sus axones forman la vía piramidal que conecta con la médula espinal.
- b. Motoneurona inferior (MNI): los cuerpos celulares se localizan en la asta anterior de la médula espinal. Los axones de las MNI son las que realizan la sinapsis directamente con los músculos.

Clasificación motoneuronas somáticas según las fibras que inervan:

- i. Motoneuronas alfa: son las responsables de la contracción voluntaria y también contribuyen al control del tono muscular.
- ii. Motoneurona beta.

- iii. Motoneurona gamma: regulan la sensibilidad de la contracción muscular<sup>9,10,11</sup>.
- 2. Motoneuronas viscerales especiales.
- 3. Motoneuronas viscerales generales.

Como enfermedades de la motoneurona se entiende a un grupo de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la destrucción de neuronas motoras. Se trata de un término general que abarca diferentes categorías de trastornos afectando a las células del asta anterior, nervios periféricos, uniones neuromusculares y músculos esqueléticos (tabla D)<sup>12</sup>.

Tabla I. Clasificación neuroanatómica de las enfermedades neuromusculares.

<i>Nivel de la lesión</i>	<b>Hereditaria</b>	<b>Adquirida</b>
<i>Asta anterior</i>	Atrofia muscular espinal	Síndrome postpolio
	Esclerosis lateral amiotrófica	
<i>Nervio</i>	Enfermedad de Charcot–Marie–Tooth	Sdme. De Guillain–Barre
		Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica
		Gammapatía monoclonal de significado incierto
<i>Unión neuromuscular</i>		Miastenia Gravis
		Síndrome miasténico de Lambert-Eaton
<i>Músculo</i>	Distrofia muscular de Duchenne	
	distrofia muscular de Becker	
	Distrofia facioescapulohumeral	
	Distrofias musculares del anillo óseo	
	Distrofia muscular de Emery-Dreifuss	
	Distrofia muscular oculofaríngeo	
	Distrofia miotónica de Steinert	
	Enfermedad de Pompe	
	Miositis por cuerpos de inclusión	
	Dermatomiositis	

**Fuente:** Iolascon y cols. 2019<sup>12</sup>.

El sistema neuromuscular incluye músculo esquelético, neuronas motoras en la médula espinal y el cerebro, que controla movimientos voluntarios del cuerpo humano. Cualquier condición que afecta a este sistema se define como una enfermedad neuromuscular, siendo ELA una de las más graves.

Aunque el deterioro muscular es el principal determinante, no se puede olvidar el daño óseo que ocasiona estas enfermedades ya que podría desempeñar un papel en el pronóstico, y consecuentemente en el nivel de calidad de vida. Ello puede ser explicado desde puntos de vista fisiológicos y patológicos, puesto que músculo y hueso tienen una relación estrecha entre sí<sup>12</sup>.

### 1.3 **Esclerosis Lateral Amiotrófica.**

ELA es la forma más frecuente de enfermedad progresiva de la neurona motora. Se trata de la enfermedad neuronal más devastadora de todos los trastornos neurodegenerativos<sup>13</sup>. Se caracteriza por una progresiva pérdida de las motoneuronas superiores e inferiores (a nivel bulbar o espinal<sup>13</sup> y, en menor medida, de la médula espinal y el córtex cerebral. Algunos estudios se refieren a esta enfermedad como un síndrome, debido a que recientes avances indican la heterogeneidad en el fenotipo, sustrato patológico y predisposición genética. Por lo que la presentación clínica de ELA y su posterior progresión pueden variar<sup>14</sup>.

El estudio científico de la enfermedad se inició con Aran en 1847 (François-Amilcar Aran, 1817-1861) en París, cuando por primera vez en la literatura médica contemporánea se describió el caso de un labriego con amiotrofias progresivas en sus miembros inferiores. Más tarde, entre los años 1869 y 1887, Charcot (neurólogo francés, Jean-Martin Charcot) individualizó definitivamente esta dolencia señalando el daño simultáneo de las neuronas motoras superior e inferior, y es quién describe por primera vez el nombre de la enfermedad:

- **Esclerosis lateral:** pérdida de fibras nerviosas acompañadas de una esclerosis (del griego, “endurecimiento”) o cicatrización glial en la zona lateral de la médula espinal, que son las regiones que ocupan las fibras o axones responsables del control de los movimientos voluntarios.

- **Amiotrófica:** (del griego; a: negación, mio: músculo, trófico: nutrición). Señala la atrofia muscular que se produce por inactividad muscular crónica, al dejar de recibir los músculos las señales nerviosas.

Diferentes personajes públicos han padecido esta enfermedad, como son el compositor ruso Dimitri Shostakovic, el líder chino Mao Tse-Tung, el físico Stephen Hawking o el jugador de béisbol Lou Gehrig (figura 5). A raíz de todos estos eventos, la enfermedad de ELA es conocida también como enfermedad de Charcot en Francia, de Lou Gehrig en EE.UU. o como enfermedad de la motoneurona (EMN) puesto que forma parte de una de las cinco EMNs: esclerosis lateral primaria (ELP), atrofia muscular progresiva (AMP), parálisis bulbar progresiva (PBP), y parálisis pseudobulbar<sup>13,15,16,17</sup>.



Figura 5. Distintos personajes públicos que han padecido ELA. 1: Dimitri Shostakovic. 2: Mao Tse-Tung. 3: Stephen Hawking. 4: Lou Gehrig.

Actualmente se conocen tres tipos de ELA:

1. **Esporádica:** es la más frecuente, afecta al 90-95% de las personas con esta enfermedad. No tiene ningún componente genético heredado. Se desconoce su etiología<sup>18</sup>, aunque se cree que puede deberse a factores ambientales, toxinas o alteraciones genéticas<sup>19,20</sup>.
2. **Territorial o de Guam:** nombrada así por la elevada incidencia en la isla de Guam y demás zonas del pacífico, asociada al consumo de determinados tóxicos.
3. **Familiar:** 5-10% de los casos, con componente hereditario<sup>16,21-23</sup>. Hay evidencias de que puede estar causada por mutaciones en diversos genes<sup>19,20,24</sup>, de los que se obtienen proteínas tales como:

- Superóxido dismutasa 1 (SOD1): cataliza en el organismo algunas especies radicales de oxígeno (ROS), como es el superóxido (ver apartado de Radicales de estrés oxidativo).

- La proteína vinculante al DNA-43 (TDP-43): es una proteína priónica implicada en la regulación del esplicing (corte y empalme) de muchos genes y de la estabilidad de los mRNA. Su mutación es responsable del 5% de los casos de ELA familiar<sup>19,20,24</sup>. A pesar de que la transmisión de célula a célula de TDP-43 no ha podido ser demostrada, se ha comprobado *in vitro* que contiene dominios “prion-like”, como se ha indicado anteriormente, pudiendo desarrollar su actividad priónica. Por otro lado, se encontró la mutación de otra proteína similar a la proteína TAR, la proteína FUS/TLS.

- Proteína de unión al ARN FUS / TLS: esta proteína está implicada alrededor del 4% de los casos de ELA familiar. Tanto TDP-43 como FUS poseen

dominios “prion like”, que se ha visto implicado en la agregación y defecto de TDP-43 y FUS que producen toxicidad celular<sup>20</sup>.

- Proteína “chromosome 9 open reading frame 72”: derivada del gen c9orf72, es responsable del 30% de los casos de ELA familiar. Se encuentra muy extendida en el cerebro, en el citoplasma de neuronas y en terminaciones presinápticas, y su mutación puede causar alteraciones en el metabolismo y procesamiento de RNA<sup>20,25</sup>.

Sobre la base de aparición de los síntomas, ELA se clasifica como una enfermedad que puede ser bulbar o espinal, y la subclasificación fenotípica adicional se basa en el alcance de la disfunción de la MNS y MNI<sup>25,26</sup>. ELP, AMP y PBP imitan el fenotipo de ELA, pero varían en la severidad de la enfermedad y en el pronóstico.

## ❖ **Signos y síntomas**

Aunque la principal característica clínica en ELA es una combinación de daños en la MNS y la MNI que implican el tronco encefálico y múltiples regiones de inervación de la médula espinal<sup>24</sup> (tabla II), las diferentes expresiones fenotípicas de ELA se clasifican principalmente como:

- ELA de inicio espinal con una combinación de signos de MNS y MNI.
- ELA de inicio bulbar, caracterizado por dificultades de habla y de deglución, que en estadios posteriores se observa debilitamiento de miembros<sup>24,27,28</sup>.

Tabla II. Signos y síntomas de la enfermedad según disfunción del tipo de neurona.


DISFUNCIÓN Motoneurona Superior		DISFUNCIÓN Motoneurona Inferior
Afectación bulbar		Debilidad severa
Debilidad moderada		Fasciculaciones
Espasticidad		Espasmos musculares
Hiperreflexia		Hipotonicidad muscular
Reflejos de extensor plantar		Atrofia muscular
		Hiporreflexia

Tabla completa de la enfermedad realizado por Charcot hace más de 140 años, sigue sin cambios. Elaboración propia.

Inicialmente, puede presentarse con síntomas muy inespecíficos, tales como: torpeza, dolor articular, calambres musculares, debilidad y/o movimientos repentinos, etc. que en ocasiones el propio paciente puede confundirlos con la propia vejez, dilatando su correcto diagnóstico. Se ha descrito en la literatura que incluso el habla o la respiración, más típicas de ELA avanzada, pueden presentarse en etapas iniciales, lo cuál hace imposible ordenar cronológicamente los síntomas, dado que variarán en cada persona<sup>29</sup>.

Por lo general, los síntomas iniciales suelen ser asimétricos, con debilidad de los músculos focales, que puede progresar y desgastar la musculatura, llegando a invalidar a la persona<sup>30</sup>, por lo que estos pacientes pueden combinar síntomas bulbares y espinales<sup>31</sup>.

No suelen verse afectados los esfínteres, salvo en estadios finales de la enfermedad. Lo mismo ocurre en la musculatura ocular, manteniendo el paciente la capacidad de movimiento hasta fases más tardías. Por otro lado, en la mayoría de los casos, los reflejos tendinosos se vuelven patológicamente abruptos con un patrón simétrico<sup>32</sup>, que pueden propagarse más allá del grupo muscular estimulado de una manera anormal como, por ejemplo, sacudidas en miembros superiores de los dedos y un reflejo aductor positivo cruzado en los miembros inferiores. Uno de los signos característicos de esta enfermedad es el signo de Hoffmann (figura 6), muestra una estimulación plantar de los músculos extensores y un signo positivo en los miembros superiores<sup>13</sup>.

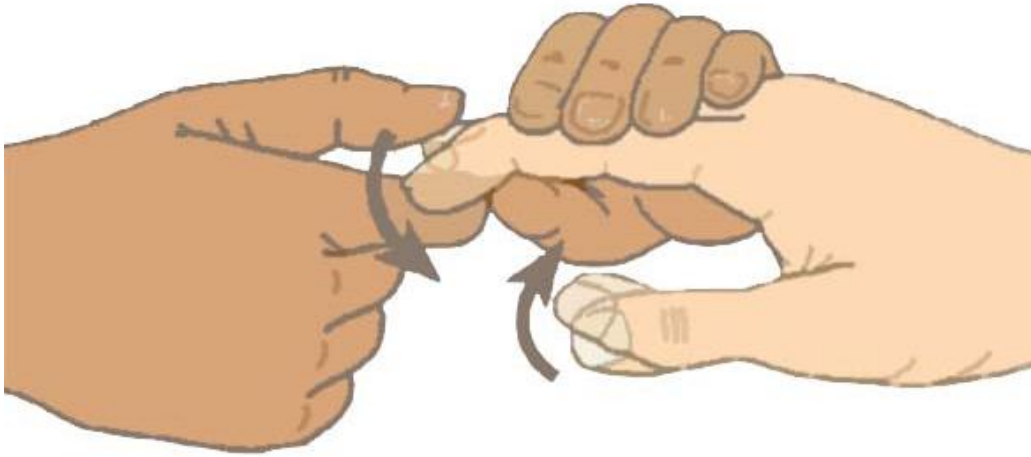


Figura 6. Signo Hoffmann. Se flexiona falange distal y se observa si hay movilidad o no del dedo pulgar. Modificado de Evaluación del movimiento en flexoextensión, flexiones laterales y rotación axial.

En los pacientes con ELA bulbar pueden aparecer síntomas como flacidez muscular o hipertonía, manifestada por aumento de la resistencia al movimiento pasivo de una extremidad, disartria espástica caracterizada por el habla lenta y distorsionada<sup>33</sup>. Esta espasticidad se produce dentro de la corteza motora, responsables de crear el reflejo primitivo, conocido como signo de Babinski<sup>34</sup>.

Dicha espasticidad no produce dolor directo, pero si indirecto ya que provoca calambres, alterando la destreza manual y causando fatiga muscular<sup>35</sup>. Por otra parte, el daño en la MNS incluye debilidad generalizada de la mitad inferior de la cara, provocando dificultad para sellar los labios e hinchar los carrillos<sup>28</sup>, debilitamiento de la lengua, pérdida de peso y fasciculaciones junto con disartria flácida<sup>36</sup>, provocando sialorrea debido a la dificultad para tragar la saliva, conservando el reflejo nauseoso.

Algunos pacientes pueden presentar parálisis pseudobulbar, que implica estallidos prolongados de risas o llantos que no están en proporción con la situación o que no son apropiados para el momento. Otros síntomas pseudobulbares incluyen labilidad emocional y bostezos excesivos en un número sustancial de casos<sup>28</sup>.

En cuanto a pacientes con ELA de inicio espinal, los síntomas suelen ser más a nivel musculoesquelético, con fasciculaciones, parálisis flácida seguida de atrofia, fibrilaciones musculares, hipotonía, atenuación o abolición de reflejos, pérdida de masa muscular, debilidad y atrofia de miembros<sup>27</sup>. Además, pueden desarrollarse simultáneamente síntomas bulbares que ocurren en un periodo de 1-2 años.

Durante las últimas etapas de la enfermedad, una de las complicaciones más descrita es la disnea, ortopnea o hipoventilación, desencadenando una hipercapnia y dolores de cabeza vespertinos<sup>37</sup> y/o neumonía, a causa del debilitamiento de los músculos respiratorios. Un indicativo atípico de mal pronóstico, es la pérdida de peso<sup>38</sup>.

La insuficiencia respiratoria suele ser la principal causa de muerte en ELA, como resultado de complicaciones pulmonares<sup>39</sup>.

## ❖ **Epidemiología de ELA**

Realizar un estudio epidemiológico exhaustivo sobre ELA es una ardua tarea difícil de completar, dada la casuística de la regionalización de los estudios por países o por zonas geográficas. Si a esto se añade la naturaleza de la propia enfermedad y sus diferentes subtipos, puede ser más complicado aún, si cabe.

Además, existen diferencias temporales a raíz de la reunión de El Escorial en 1994, en la que se establecen unos parámetros diagnósticos que se han tomado como referencia, y cuyo uso ha provocado una sensible variación entre datos epidemiológicos anteriores y posteriores a esa fecha<sup>40</sup>.

Durante la década de los noventa, el número de casos notificados de ELA fue de entre 1,5 y 2,7 por 100.000 habitantes en Europa<sup>41,42</sup> y América del Norte<sup>40</sup>. Estudios recientes han demostrado que la prevalencia de la enfermedad no ha aumentado en la última década (95% intervalo de confianza [IC] 2,63 a 2,91)<sup>24,43</sup>.

Concretamente en España, la incidencia se acerca entre 2 y 5 casos por cada 100.000 habitantes al año, y la prevalencia es de 1 cada 100.000, lo que equivale a que, más de 40.000 españoles desarrollaran la enfermedad. Además, se estima que en España cada año se diagnostican 900 casos nuevos de ELA, es decir, de 2 a 3 casos diarios.

Existen estudios que demuestran un aumento del riesgo en la relación hombre-mujer (hombres/mujeres = 1,5: 1)<sup>44-46</sup>; por lo contrario, también existen otros estudios que demuestran un equilibrio en esta ratio<sup>40,47</sup>. Estas diferencias, se han tratado de explicar por la protección hormonal de las mujeres, así como por una mayor exposición a factores de riesgo por parte de los hombres.

En cuanto a la edad de inicio de ELA, esta varía entre los 50 y 65 años de edad. Sólo el 5% de los casos tienen un inicio antes de los 30 años<sup>17,41-43</sup>. En personas alrededor de los 80 años, esta incidencia aumenta (10,2 / 100,00 en hombres y 6,1 / 100,000 en mujeres)<sup>48</sup>.

Respecto al tiempo medio de supervivencia, el 50% de los pacientes fallece en un plazo de entre los 16 y los 24 meses, llegando al 80% en un plazo de 5 años desde su diagnóstico, siendo una variable importante la edad a la que se diagnostica. De igual manera ocurre con la progresión de la enfermedad, que se asocia a la edad y a la forma de ELA que padece. Se han descrito casos de pacientes que sobreviven 2 años con PBP, mientras que otras variantes más benignas pueden sobrevivir hasta 40 años tras ser diagnosticadas<sup>49</sup>.

La mayoría de los casos de ELA son esporádicos, pero entre un 5 y un 10% de los casos tienen antecedentes familiares. ELA familiar tienen un patrón autosómico recesivo, afectando por igual a hombres y mujeres y siendo diagnosticados aproximadamente una década antes que los casos de ELA esporádico, y con un corto periodo de supervivencia<sup>18,21-23,50</sup>.

Otra forma de ELA es la territorial, que afecta a habitantes de diferentes zonas del pacífico oeste que incluyen a la isla de Guam<sup>51</sup> y las Marianas, península de Kii en la isla de Honshu (Japón) y los habitantes de Auyu y Hakai al sureste de Nueva Guinea, donde ELA está asociada al Parkinson y a la demencia. Este tipo de ELA se vincula con un locus endémico cuya prevalencia es 50-100 veces más alta que en cualquier otra parte del mundo, a pesar de que esta evidencia no es concreta, se cree que el aumento de incidencia en estas regiones se debe a factores ambientales, específicamente a aminoácidos neurotóxicos, como la  $\beta$ -metilamino-L-alanina (BMAA) producida por una cianobacteria simbiótica en las raíces de la cicada (figura 7), que comúnmente se encuentra en estas áreas. Además, se plantea la hipótesis de que los pacientes en estas regiones que desarrollan ELA tienen una incapacidad para prevenir la acumulación de BMAA<sup>52-54</sup>.



Figura 7. Ejemplo de Cicada. Fuente: <http://garciaspalms.com/palm-trees.html>.

Por otro lado, algunos autores han propuesto una posible relación entre ELA y la participación deportiva, pero no ha sido demostrada por el momento. Como sostienen Abel 2007<sup>55</sup>, Al-chalabi y Leight, 2005<sup>56</sup>, Chió y cols, 2005<sup>57</sup> o Chen y cols, 2007<sup>58</sup> en diferentes estudios de jugadores de fútbol profesional italiano, se encontró un aumento severo en la incidencia de ELA, tal y como demostró el estudio realizado por el Instituto Nacional de Ciencias de la Salud Ambiental de Estados Unidos<sup>57</sup>, donde se observó una correlación entre los traumatismos craneoencefálicos y un mayor riesgo de padecer ELA (Odds ratio [OR] = 3,2; IC del 95% 8,1). Sin embargo, traumatismos en otras partes del cuerpo no se asociaron con mayor riesgo.

### ❖ **Diagnóstico.**

La complejidad de la enfermedad de ELA hace necesaria un diagnóstico temprano, al tratarse de una enfermedad degenerativa. En la actualidad, se ha estimado que el diagnóstico se retrasa entre trece y dieciocho meses<sup>59</sup>. Esto puede ser explicado a causa de las diversas presentaciones clínicas iniciales y la superposición sintomática con varios trastornos neurodegenerativos. Contribuyendo todo ello a la dificultad para diagnosticar ELA con una certeza aceptable<sup>60</sup>.

Por este motivo, el diagnóstico es clínico y se puede decir que es en base a la exclusión de otras causas que pueden producir disfunción progresiva de MNS y MNI<sup>21,60</sup>.

Durante el siglo XIX los primeros neurólogos en estudiar la enfermedad, establecieron las bases para el diagnóstico, que actualmente se siguen utilizando, evaluando reflejos tendinosos para evaluar la afectación de las MNI y MNS. Además, se han introducido numerosos avances, tales como la histopatología, neurofisiología con técnicas de neuroimagen (TAC o Rayos X, resonancia magnética), estudios de conducción nerviosa o electromiografía. Así mismo, existen criterios estándar que ayudan a descartar muchos de los diagnósticos diferenciales de ELA. Este proceso incluye la obtención de una historia clínica completa del paciente, la realización de un examen minucioso, pruebas de laboratorio adecuadas, electrodiagnóstico, y estudios de neuroimagen, así como pruebas genéticas<sup>25,60-63</sup>.

Los criterios de El Escorial para el diagnóstico de ELA fueron publicados en 1994 por la Federación Mundial de Neurología con los estándares de inclusión de los pacientes que participan en estudios de investigación y ensayos clínicos<sup>61</sup>. Por otro lado, los criterios de “Airlie House, 1998” centran los exámenes de laboratorio como herramientas diagnósticas para excluir el diagnóstico diferencial<sup>61,64</sup>. Finalmente, en el año 2000, el algoritmo de Awaji fue incorporado, incluyendo mediciones neurofisiológicas de la degeneración de la MNI mientras que la disfunción de la MNS permanece basada en la clínica. Estos criterios de Awaji, dan igual importancia a las anomalías clínicas que al electromiograma (EMG)<sup>65</sup>.

Diferentes estudios de seguimiento validan el uso de este algoritmo, ya que, ha demostrado con éxito la capacidad de detectar pacientes con ELA sin aumentar el número de falsos positivos<sup>60,64,66,67</sup>.

Todos estos criterios ayudan a diferenciar ELA de otras enfermedades que pueden presentar similares síntomas, como es el caso de la neuropatía motora multifocal, enfermedad de Kennedy (EK) o el síndrome post-polio (SPP). Esta diferenciación es muy importante, ya que, la neuropatía motora multifocal puede ser tratada con inmunoglobulina intravenosa, a diferencia del ELA.

## ➤ **Pruebas diagnósticas.**

Como ya se ha mencionado, no existe una prueba única o absoluta para el diagnóstico de ELA, por ello se realiza un extenso análisis de las pruebas para ayudar a descartar los distintos diagnósticos diferenciales.

- Estudios de laboratorio: las pruebas de laboratorio típicas son la velocidad de sedimentación de los eritrocitos, la electroforesis del suero, proteínas urinarias, pruebas de función tiroidea, las mediciones del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y fosfato sérico y el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR). La detección de metales pesados está indicada en pacientes con antecedentes de exposición<sup>25</sup>.

En cuanto al seguimiento de la enfermedad y pronóstico, un estudio publicado por Lunetta C, et al en *Jama Neurology*<sup>68</sup>, ha demostrado la relación directa entre la elevación de la proteína C reactiva (PCR) sérica y un progreso más rápido de la enfermedad. La PCR es un biomarcador de la respuesta inflamatoria que muestra un valor pronóstico significativo para varias enfermedades, esta elevación en pacientes con ELA, puede reflejar un estado neuroinflamatorio potencialmente sensible a los reguladores inmunes como NP001.

- Estudios de neuroimagen: los estudios de resonancia magnética (RM) del cerebro y la médula espinal son la técnica de neuroimagen más útil en ELA, principalmente para excluir síndromes que pueden imitarla. Las tecnologías más avanzadas de neuroimagen son métodos de investigación muy útiles que pueden ayudar a identificar patologías asociadas específicamente a ELA de una manera no invasiva, ya que no hay características específicas en una resonancia magnética que se correlacionen bien con ELA. Por lo que, la neuroimagen se hace a menudo para ayudar a excluir el diagnóstico diferencial en lugar de confirmar el diagnóstico de ELA<sup>25,69</sup>.

- Pruebas de electrodiagnóstico: son una herramienta de diagnóstico útil en la investigación de pacientes que pueden tener ELA. La electromiografía (EMG) y los estudios de conducción nerviosa, son más sensibles para la detección de la enfermedad y pueden cuantificar su signo característico que es la degeneración MNI. En ella se puede observar anomalías típicas de pacientes con ELA, como son las fasciculaciones (PF) y descargas de denervación espontánea, indicativas de

reinervación. Estas PF se definen en la EMG como unas ondas agudas positivas, pero pueden no manifestarse hasta que un tercio de las neuronas motoras se han perdido. Por otro lado, estas ondas de PF también están presentes en el síndrome de fasciculación benigna (SFB), así como en muchas otras entidades, por lo que es necesario completar este estudio con otras pruebas diagnósticas<sup>25,60,61,65,70</sup>.

· Entre las pruebas de electrodiagnóstico destaca la electromiografía (EMG): es una técnica que permite registrar gráficamente la actividad eléctrica producida por los músculos esqueléticos y, por tanto, constituye una extensión de la exploración física y prueba la integridad del sistema motor<sup>71,72</sup>. La actividad eléctrica generada por las fibras musculares se mide en microvoltios ( $\mu\text{V}$ ), por esto mismo, los electromiógrafos deben ser capaces de captar señales minúsculas de voltaje, traducándose en una alta sensibilidad. Por otro lado, la electromiografía ha sido ampliamente estudiada para el control y seguimiento de la musculatura y evolución de enfermedades neuromusculares, entre ellas ELA<sup>73-76</sup>. La EMG se explicará más en detalle en el apartado de valoración electromiográfica de una intervención con antioxidantes.

## 1.4 **Sistema musculoesquelético. Posible relación con la enfermedad de ELA.**

El sistema musculoesquelético engloba tanto el componente muscular como el conjunto de huesos que conforman el esqueleto. Ambos componentes son interdependientes en los aspectos metabólicos, fisiológicos y mecánicos.

El esqueleto, además de cumplir su función de protección de órganos vitales y de fijar la musculatura permitiendo la locomoción, también tiene una función metabólica, ya que, además de actuar como depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato<sup>77</sup>, está implicado en la homeostasia de la calcemia y fosfatemia. Además, las células madre mesenquimales de la médula ósea (MSC) tienen la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células<sup>78</sup>.

Estructuralmente hablando, el hueso está formado por una matriz extracelular en gran parte mineralizada. Sólo un 10% está formado por proteínas no colagénicas, siendo la osteocalcina la matriz más abundante, el restante 90% está construida con fibras de colágeno tipo I (>95%) y Colágeno V (<5%)<sup>79</sup>.

El hueso es una importante fuente de factores de crecimiento osteogénicos como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1)<sup>80</sup>, proporcionando así, estímulos anabólicos para la remodelación ósea y células madre osteogénicas derivadas del músculo, que juegan un papel importantísimo en el mantenimiento de la homeostasis ósea.

Además, la forma de los huesos está constantemente regulada por la fuerza de la musculatura, alterándose de esta manera la forma de estos en enfermedades neuromusculares<sup>81</sup>.

Las células responsables de la osteogénesis (figura 8), que también se encargan del modelado óseo, son los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos.

- Los osteoblastos son células que recubren todas las superficies óseas como "células de revestimiento". A medida que los osteoblastos se encapsulan en la matriz ósea durante el modelado y la remodelación, se vuelven inactivos convirtiéndose en osteocitos.
- Los osteoclastos son grandes células multinucleadas que se encarga de la resorción del hueso viejo o dañado debajo del periostio<sup>77</sup>.

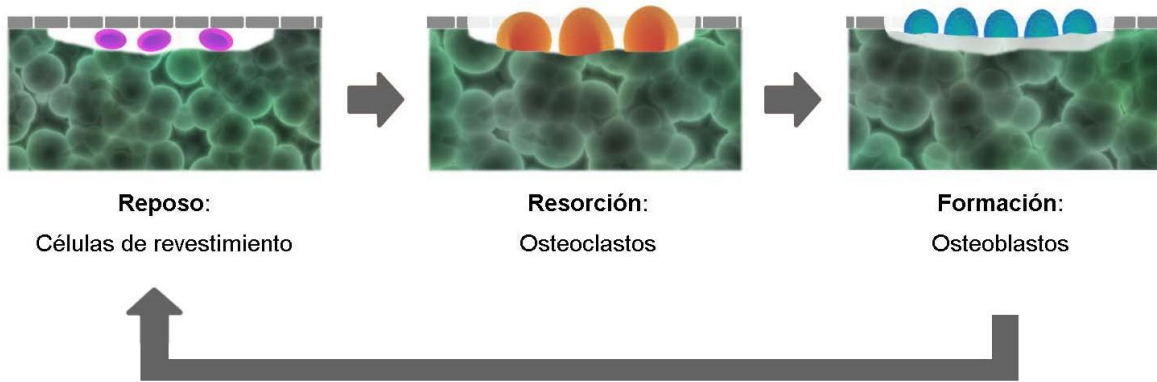


Figura 8. Tipos de células óseas. Elaboración propia.

Por estas razones, la morfología ósea puede estar alterada en enfermedades que afectan al sistema neuromuscular.

Por otro lado, el hueso es también un importante productor de factores tróficos musculares entre los que se encuentra VEGF, FGF-2, BMP, y de IGF-1 que son críticos para el crecimiento y mantenimiento de la homeostasis de las neuronas y de los músculos. Siendo este el motivo por el cual la alteración de la homeostasis ósea podría exacerbar la degeneración muscular y acelerar la progresión de la enfermedad en pacientes con alteración neuromuscular<sup>78</sup>.

Del mismo modo, el tejido muscular también se encarga de homeostasis del hueso, liberando moléculas específicas llamadas mioquinas que actúan como hormonas y se piensa que interactúan con el hueso a través de diferentes vías. La miostatina pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ), expresado en el músculo, y al mismo tiempo, modula el metabolismo óseo, promoviendo diferenciación de osteoclastos y pérdida ósea inductora<sup>82</sup>.

A parte de todo, la contracción muscular promueve la liberación de moléculas protectoras óseas, incluida la irisina, que, se trata de una hormona que estimula los osteoblastos e inhibe las actividades de los osteoclastos a través de la vía de señalización NFkB, aumentando el grosor cortical óseo<sup>83</sup>.

En este mismo sentido, se han identificado otras sustancias de vital importancia como el ácido b-aminoisobutírico (BAIBA) y musclina, que podrían mejorar la acumulación ósea y previenen la pérdida ósea activando precursores de osteoblastos e inhibiendo la osteoclastogénesis<sup>12</sup>.

Paralelamente, otros procesos fisiológicos pueden estar involucrados en la remodelación ósea, pudiendo estar alterados en enfermedades crónicas, como son:

▪ **Factores endocrinos:**

- **Hormona paratiroidea (PTH):** hormona secretada por la glándula paratiroides cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en plasma disminuye. De modo que regula la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y del fosfato. Sin embargo, cuando se secreta continuamente, la PTH induce factores de acoplamiento osteoblastos-osteoclastos, lo que promueve la resorción al aumentar la secreción de RANKL, por lo que puede ser una diana terapéutica<sup>84,85</sup>.
- **Calcitonina:** producida por las células C parafoliculares de la glándula tiroides. Altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en plasma estimulan su secreción, promoviendo su excreción renal. Además, como efecto secundario al actuar sobre los osteoclastos, promueve la formación de hueso<sup>86</sup>.
- **Andrógenos:** son hormonas necesarias para el crecimiento normal y mantenimiento de la salud ósea. Siendo la testosterona la responsable del aumento de la absorción esquelética del  $\text{Ca}^{2+}$  en preadolescentes. Por lo que se trata de otra diana terapéutica<sup>87</sup>. Los andrógenos influyen en el crecimiento óseo longitudinal durante la pubertad.
- **Estrógenos:** se trata de otra hormona, que parece desempeñar un papel más importante que la testosterona en la prevención de la pérdida ósea en hombres<sup>88,89</sup>. Además, interviene en el cierre epifisario durante la pubertad tardía tanto en hombres como en mujeres<sup>90</sup>. Los estrógenos disminuyen la capacidad de respuesta de las células progenitoras de osteoclastos a RANKL, evitando la formación de osteoclastos y acortando la vida útil de estos, también regulan al alza la producción de OPG, IGF y TGF- $\beta$ , promoviendo la formación de hueso<sup>91</sup>.
- **Glucocorticoides:** actúan en la remodelación ósea, y su actuación es esencial para la maduración de los osteoblastos de las células madre mesenquimales. Tiene tanto efectos estimulantes para la formación ósea, como efectos de inhibición<sup>92</sup>.
- **Hormonas tiroideas:** necesarias para el desarrollo esquelético y el establecimiento de la masa ósea máxima. Se ha relacionado tanto el hipo- como el hipertiroidismo, con un mayor riesgo de fractura<sup>93</sup>. Se cree que existe

una interacción dependiente entre la hormona tiroidea, el factor de crecimiento similar a la insulina I y la vía de señalización Wtn /  $\beta$ -catenina<sup>94</sup>.

▪ **Factores nutricionales:**

- **Magnesio ( $Mg^{2+}$ ):** es el cuarto catión más importante, tras el  $Na^+$ , potasio ( $K^+$ ) y el  $Ca^{2+}$ , y el segundo catión intracelular más abundante. Desempeña un papel importante en la función enzimática, el transporte de iones transmembrana y en la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$ . Es por esto por lo que valores bajos de  $Mg^{2+}$  se han asociado con osteoporosis, además de un aumento de osteoclastos y estimulación de citoquinas inflamatorias como  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  (Interleuquina 1 beta) e  $IL6$  (Interleuquina 6), que son mecanismos necesarios para la resorción ósea<sup>95</sup>. Aunque el  $Ca^{2+}$  es el principal mineral en el hueso, su combinación con otros bioelementos como el  $Mg^{2+}$ , contribuye al aumento de este mineral óseo<sup>96</sup>. Toba y cols<sup>97</sup>, publicaron que la suplementación de  $Mg^{2+}$  en ratas, promueve la formación de hueso, mediante la activación de osteoblastos e inactivación de osteoclastos. Además, se han encontrado valores elevados de citoquinas inflamatorias en huesos de ratones con deficiencias de  $Mg^{2+}$ , por lo que se especuló que, podría guardar relación el  $Mg^{2+}$  con la resorción ósea<sup>98,99</sup>.
- **Vitamina D (Vit. D):** se trata de una vitamina liposoluble a partir del metabolito 7-deshidrocolesterol, obtenida mediante la exposición solar. El calciferol o Vit. D activa, se origina en un 90% en la piel por los efectos de la radiación ultravioleta  $\beta$  (UVB) sobre el 7-deshidrocolesterol, para transformarse en Vit.D<sub>3</sub>. El 10% restante se obtendrá mediante alimentos como pescado graso.

Al ser absorbida, la Vit. D sufre un procesamiento dentro del cuerpo hasta la obtención de su derivado activo, teniendo una primera hidroxilación en el hígado, convirtiéndose en 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] (calcidiol). Una segunda hidroxilación estimulada por la PTH y niveles bajos de fosfatemia, ocurre en el riñón, convirtiéndose en 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> (calcitriol) o Vit. D activa<sup>100</sup>.

Tanto la Vit. D como sus metabolitos, participan en: procesos de mineralización ósea mediante el aumento de la absorción del calcio y fosfato, en la homeostasis del calcio, fósforo y magnesio, y en la remodelación ósea

mediante el receptor de la Vit. D. Este receptor, se expresa en superficies celulares del intestino, tiroides y riñón, además, es esencial para facilitar la absorción de calcio.

Bajos niveles de esta vitamina pueden causar raquitismo u osteomalacia, y como resultado se obtiene un hueso nuevo pobremente mineralizado causando ablandamiento y deformación ósea. También puede provocar un aumento de la PTH en suero, que conduce a la resorción ósea, osteoporosis y un mayor riesgo de fractura<sup>101</sup>.

Sin embargo, una revisión publicada en *The Lancet*<sup>102</sup>, concluyó que existía muy poca evidencia sobre el beneficio en la suplementación de Vit. D en hueso, existiendo un minúsculo beneficio en algunos estudios en cuello femoral, pero no en cadera, siendo definido este hallazgo como casual o artificial.

Por otro lado, existe una controversia en la literatura entre la relación del pronóstico y valores de Vit. D en ELA<sup>103-105</sup>. Camut y cols (2014)<sup>105</sup>, llegaron a la conclusión de que la Vit. D sí que era un marcador de pronóstico de ELA. Por el contrario, Blasco y cols (2015) publicaron que, según sus resultados, la Vit. D no guarda dicha relación. A pesar de todo, parece inevitable la hipótesis de la relación existente entre ELA y Vit. D, dado que, en un estudio reciente se comprobó que las células neuronales en cultivo mejoraban la supervivencia dependiendo de la dosis de Vit. D administrada, llegando a bloquear completamente la muerte celular inducida por el ligando FAS<sup>105</sup>. Otros estudios suministraron una dieta baja en Vit. D a ratones SOD1, observando un retraso en la aparición de la enfermedad, sin embargo, disminuyó el rendimiento motor de estos<sup>106,107</sup>.

No solo se ha estudiado la relación de la Vit. D en ELA, sino que también ha sido estudiada en otras enfermedades neurológicas como esclerosis múltiple<sup>108</sup>, Alzheimer<sup>109</sup>, entre otras.

Para finalizar, se han encontrado receptores de metabolitos de Vit. D en distintos sistemas, entre ellos el muscular<sup>101,110</sup>. Por lo que se sobreentiende que la relación entre Vit D, hueso y ELA es inequívoca, al existir multitud de estudios que demuestran que los bajos niveles plasmáticos de 25OH VD se

asocian a un peor pronóstico en enfermedades neurodegenerativas en general<sup>111-115</sup>.

▪ **Actividad física:**

Se ha relacionado la actividad física de carga con un aumento de la DMO, óptima como intervención entre los jóvenes y para reducir la pérdida ósea en adultos. De esta manera, se promueve mayores ganancias de tejido óseo que la carga estática. En contraposición, se ha visto que estados de inmovilización o sedentarismo, promueven la disminución de la DMO<sup>116</sup>.

▪ **Factores neurológicos:**

Tanto neuronas como neurotransmisores, tienen sus efectos sobre la remodelación ósea. El hueso tiene abundantes conexiones neuronales a lo largo de los vasos adyacentes a la trabécula ósea<sup>117</sup>. Tanto osteoblastos como osteoclastos poseen receptores adrenérgicos  $\beta_2$  y receptores para neurotransmisores como glutamato y neuromedina U, existiendo así una relación directa del SNP con la regulación del metabolismo óseo<sup>118,119</sup>.

Por otra parte, el SNC mediante el hipotálamo, también interviene en el metabolismo óseo, a través de un receptor adrenérgico de leptina  $\beta_2$ , esta hormona se encarga de regular la masa de tejido adiposo mediante interacción del hipotálamo, actuando sobre la sensación de hambre y el uso de energía. Se ha estudiado en ratones, que aquellos que carecen de un receptor de leptina funcional son obesos y estériles, y a pesar del hipogonadismo, que es la causa más común de osteoporosis, tiene una masa ósea alta. Se observó que aquellos ratones tratados con isoproterenol, (un agonista  $\beta$ ) mostraron una disminución masiva de la masa ósea, por el contrario, los ratones con señalización bloqueada del sistema nervioso simpático (SNS), exhibieron una alta masa ósea<sup>120</sup>.

### **1.4.1 Osteoporosis.**

La osteoporosis es una enfermedad del hueso, caracterizada por una disminución de la masa ósea, aumentando así el riesgo de fracturas directamente relacionada con edad.

Con el envejecimiento y en muchas afecciones óseas patológicas, la resorción cambia para exceder a la formación de hueso, resultando en un equilibrio óseo negativo y pérdida de DMO, lo que conlleva a lo que se conoce como osteoporosis.

El National Institute of Health (NIH) de EE.UU. definió osteoporosis como “*una enfermedad de todo el esqueleto caracterizada por una masa ósea baja y una alteración de la microarquitectura ósea que condiciona un hueso frágil, con el consecuente incremento del riesgo de fracturas*”<sup>121</sup>.

En 1994, la OMS<sup>122</sup> estableció los valores para definir osteoporosis, osteopenia y normalidad (tabla III). Estos valores se basan en la determinación del T-score (es decir, número de desviaciones estándar con respecto al valor medio de la población de 20 a 39 años del mismo sexo) y en la absorciometría de rayos X de energía dual (DXA), siendo esta técnica el “gold standard” en la evaluación de la DMO en la práctica clínica.

*Tabla III. Clasificación de la osteoporosis según la OMS.*

<b>Valoración</b>	<b>Valor DMO</b>
<b>Normal</b>	T-score > -1
<b>Osteopenia</b>	T-score -1 a -2,5
<b>Osteoporosis</b>	T-score < -2,5

*Elaboración propia.*

Además, esta organización, ha estimado que la prevalencia de la osteoporosis en mujeres de raza blanca mayores de 50 años está entre 15-30%, aumentando esta prevalencia con la edad hasta llegar a más de un 80% en mujeres de más de 80 años. Se calcula que un 50% de las mujeres con osteoporosis, presentaran alguna fractura a corto plazo. En cuanto a los varones, la prevalencia global es del 11,12%<sup>123</sup>.

Los principales factores de riesgo se detallan en la tabla IV, siendo los más importantes la edad y el sexo, junto a otros aspectos ya señalados como la menopausia y el hipogonadismo. Asimismo, una actividad física escasa es asociada con osteoporosis, lo mismo que la disminución de calcio y Vit. D.

Tabla IV. Factores de riesgo de la osteoporosis

Genéricos o constitucionales	Estilos de vida
Raza blanca o asiática	Nulípara
Historia familiar	Tabaquismo
Contusión	Ingesta de alcohol
Longitud del eje fémur	Inactividad
Menopausia prematura	Inmovilización prolongada
Menarquia tardía	Nutrición parenteral prolongada
Amenorrea secundaria prolongada	Bajo peso corporal
Enfermedades médicas	Fármacos
Anorexia nerviosa	Tratamiento crónico con corticoides
Hipertiroidismo	Tratamiento excesivo con hormona tiroidea
Prolactinoma	Anticoagulante
Hipercortisolismo	Anticonvulsionante
Síndrome de mala absorción	Antagonista de GnRH
Hiperparatiroidismo primario	Tratamiento inmunosupresor
Artritis reumatoide	
Cirrosis biliar primaria	
Insuficiencia renal crónica	
EPOC	
Osteogénesis imperfecta	
Postransplante	

Fuente: Elaboración propia.

La mayoría de los factores de riesgo de fracturas óseas osteoporóticas independientes se relacionan con las caídas, pudiéndose explicar por alteraciones de la vista o enfermedades que afectan la función motora como enfermedades neurodegenerativas.

La asociación entre una enfermedad neurodegenerativa y la osteoporosis, duplica la mortalidad. Esto es debido a que ambas enfermedades son limitantes, disminuyendo de esta forma la calidad de vida, y agravando la morbilidad de ambas como es el caso de la aparición o empeoramiento de la ansiedad, depresión o trastornos psicológicos.

La osteoporosis se clasifica en 2 grupos:

- Osteoporosis primaria; es el grupo más frecuente e incluye casos de osteoporosis en los que no se identifica ninguna enfermedad que la justifique directamente como son los casos de osteoporosis juvenil, postmenopáusica o la senil.

- Osteoporosis secundaria; este grupo lo constituyen aquellos casos en los que existe una causa capaz de producir esta enfermedad, la mayoría de estas son causas endocrinológicas, gastrointestinales, hematológicas, así como la inmovilización prolongada o el uso de fármacos.

En cuanto a la clínica, la osteoporosis es una enfermedad asintomática, y de ahí la importancia de valorar a las personas con riesgo, ya que las manifestaciones clínicas suelen ser la aparición de fracturas.

El diagnóstico definitivo de osteoporosis se realiza mediante pruebas complementarias como densitometría, y/o radiografías y escalas de valoración como el índice FRAX<sup>124</sup>.

El FRAX se ha confeccionado a partir de los datos basales y de seguimiento de 9 cohortes poblacionales que incluyeron a 59.232 pacientes (74% fueron del sexo femenino) de entre 40-90 años, realizando un seguimiento anual a 249.898 pacientes al año. Durante este seguimiento se registraron 3.495 fracturas por fragilidad, siendo 974 de estas, de cadera. De este modo se calculó la contribución al riesgo de fractura de los diferentes factores de riesgo (tabla V). Por otro lado, se calcularon las incidencias de fractura de cadera de cada país, mediante estudios epidemiológicos locales. Los datos referentes a la población española, proceden de 5 estudios epidemiológicos realizados en Barcelona, Sevilla, Madrid, Zamora, Canarias y Cantabria<sup>125</sup>.

*Tabla V. Factores de riesgo de fractura incluidos en el FRAX.*

---

Edad
Sexo
Índice de masa corporal
Antecedentes de fractura por fragilidad en la edad adulta
Antecedentes de fracturas de cadera en alguno de los progenitores
Tabaquismo activo
Ingesta de glucocorticoides

---

Artritis reumatoide

Osteoporosis secundaria

Consumo excesivo de alcohol

Densidad mineral ósea

Fuente: elaboración propia.

## Técnica DXA

Como ya se ha mencionado anteriormente, la técnica DXA es el “gold standard” junto con la escala FRAX para el diagnóstico de osteoporosis (figura 9). Dos Guías de Práctica Clínica (GPC), basándose en estudios de calidad con niveles de evidencia más alta (1++/+) concluyen que la técnica DXA es el procedimiento óptimo para estimar el riesgo de fractura entre las diversas tecnologías disponibles, puesto que, según la GPC sobre osteoporosis, la media de la masa ósea se debe realizar en el esqueleto central (columna y/o fémur) y con equipos de radiología concretos (DXA). Además, dicha GPC vincula la DXA con la recomendación más alta (A) para la valoración del riesgo de fractura por fragilidad. De otro modo, dicho sistema también sirve para el control de la osteoporosis y la respuesta del mismo al tratamiento farmacológico entre 1 y 2 años después del inicio del tratamiento, siendo repetida cada 2 años.

La DXA valora el T-score, que es la comparación del valor del paciente, con el valor de referencia de población adulta joven del mismo sexo y de la misma raza<sup>126</sup>.



Figura 9. Técnica DXA. Fuente: <https://www.richet.com.br/medicos/blog/avaliacao-da-composicao-corporal-por-densitometria/>

### Técnica QUS (ultrasonografía cuantitativa)

Por otro lado, la ultrasonografía cuantitativa (QUS) ha sido introducida en los últimos años para la valoración del estado óseo en la osteoporosis. Los parámetros de medición son la velocidad de transmisión (SOS), atenuación de la amplitud de onda (BUA), y el índice de calidad (I-Stiffness).

Debe quedar claro que en ningún caso mide realmente la DMO, puesto que, estas medidas reflejan las características estructurales del hueso y su influencia en la transmisión de la onda ultrasónica. Por esta misma causa, cuando se habla de DMO en QUS, se refiere en realidad a DMO estimada, ya que es calculada mediante una fórmula ( $0,002592 \times (\text{BUA} + \text{SOS}) - 3,687$  en  $\text{g/cm}^2$ ). Es por ello, que ha sido considerada como una valoración indirecta de la calidad ósea. Muchos estudios que se detallarán más adelante en este trabajo, han demostrado que tiene capacidad para predecir el riesgo de fractura, sobre todo de cadera.

En la GPC del ministerio de Sanidad del Gobierno de España, recomienda con un grado A (el más alto) la realización de la técnica QUS cuando no esté accesible la técnica DXA, nombrándola como una alternativa válida y fiable, citando textualmente; *“Cuando no pueda realizarse por falta de disponibilidad una DXA central puede emplearse una medición periférica (DXA o ultrasonometría cuantitativa) de calcáneo (equipo DXA de medición periférico o QUS)”*.

El interés de su uso reside en el hecho de que no implica radiaciones ionizantes, su bajo coste, facilidad de uso, la corta duración de la evaluación y el tamaño del instrumento, lo cual le permite ser fácilmente transportado de un lugar a otro. Además, diferentes estudios que se referencian<sup>127-133</sup>, demuestran que esta técnica tiene un papel importante en la predicción del riesgo de fracturas. Cabe recalcar, que se trata de una técnica cómoda para pacientes con trastornos neurodegenerativos por tratarse de una técnica portátil y que apenas necesita un par de minutos.

La correlación entre la DXA y la QUS es muy variable y depende más de la zona de medición que de la técnica en sí. Cuando los métodos exploran huesos semejantes (por ejemplo, calcáneo) la correlación es aceptable (0,40 a 0,60). No obstante, el hecho de que no sea equiparable a la DXA, no invalida a la QUS como

método de valoración en la osteoporosis. Como ya se ha dicho, numerosos estudios han demostrado que la QUS tiene capacidad para predecir el riesgo de fracturas osteoporóticas, y puesto que los parámetros QUS no miden cantidad ósea (DMO) como hace la DXA, es de suponer que, si predicen el riesgo de fractura ya que valoran otros aspectos determinantes de la resistencia ósea que están relacionados con la calidad del hueso, además de tener una recomendación A en la GPC sobre osteoporosis.

### **1.4.2 ELA y calidad ósea.**

Diferentes metales neurotóxicos que se relacionan con la etiología de la ELA tienen efectos también sobre la mineralización ósea, siendo transportados por arterias que nutren al periostio, sustituyendo así al  $\text{Ca}^{2+}$  o al fósforo (P) en la mineralización ósea. Estos metales son:  $\text{Mg}^{2+}$ , plomo ( $\text{Pb}^{2+}$ ), cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ), cobre ( $\text{Cu}^+$ ), hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o arsénico ( $\text{As}$ )<sup>134</sup>.

En un estudio de pacientes con ELA, se observaron niveles aumentados de metales como manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ), aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ),  $\text{Cd}^{2+}$ , cobalto ( $\text{Co}^{3+}$ ),  $\text{Cu}^+$ , zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ),  $\text{Pb}^{2+}$ , vanadio ( $\text{V}^{2+}$ ) y uranio (U), en LCR. Además, las concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  en LCR fueron mayores que en plasma (mediana de 0,91 mg / L), lo que sugiere el transporte de  $\text{Mg}^{2+}$  al SNC<sup>134</sup>.

Se ha comprobado que, en pacientes con ELA, existía una correlación entre la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  en hueso y cerebro<sup>135</sup>. Por esta misma razón, se cree que el hueso sirve como proveedor de estos metales al sistema cerebroespinal.

En cuanto al dolor durante la enfermedad, suele estar asociado a afecciones musculoesqueléticas debido a espasmos musculares y espasticidad. Dicho dolor se desarrolla secundariamente como consecuencia de daño en huesos, tendones, ligamentos, articulaciones, nervios y el músculo afectado<sup>136</sup>, observándose una disociación progresiva de las propiedades mecánicas y eléctricas del músculo. Esta alteración en la coordinación muscular y la generación de fuerza, causa un estrés anormal en los ligamentos, tendones, articulaciones y huesos<sup>137-139</sup>, que explicarían el incremento de fracturas óseas en pacientes con ELA debido a una disminución de la densidad mineral ósea<sup>140</sup>.

En un estudio experimental con ratones ALS SOD1<sup>G93A</sup> se observó una menor masa en hueso trabecular y en hueso cortical, concluyendo que la pérdida de masa ósea se debía a una menor formación ósea y a un aumento de la resorción<sup>141</sup>. Esto puede ser explicado por el progresivo deterioro muscular que produce una disminución en la fuerza, coordinación y tono. Ese deterioro conduce al desarrollo del dolor y aumento de caídas, con el consiguiente aumento del riesgo fracturas que conlleva una disminución en la calidad de vida del paciente y acelera la mortalidad de esta población. Contrariamente a la aparición del dolor, que generalmente se produce en las últimas etapas de ELA, los calambres y fasciculaciones son más frecuentes en las etapas iniciales<sup>34</sup>.

El hueso es un órgano activo que está en constante remodelación, jugando un papel muy importante el músculo esquelético, que comprende aproximadamente el 40% de la masa magra de todo el cuerpo<sup>142</sup>, viéndose afectado sustancialmente en etapas iniciales de ELA. Como ya se ha mencionado, éste actúa como importante fuente de factores de crecimiento osteogénicos FGF-2 e IGF-1<sup>80</sup>. Estos factores causan estímulos anabólicos para la remodelación ósea y división de células madre osteogénicas derivadas del músculo, que juegan un papel importantísimo en el mantenimiento de la homeostasis ósea. Además, la forma de los huesos está constantemente regulada por la fuerza muscular, por lo que la morfología ósea puede estar alterada<sup>81</sup> como ya ha sido mencionado.

Se ha demostrado que las MSC de pacientes con ELA producen menor número de factores tróficos<sup>143,144</sup>. Los resultados de estos estudios sugieren una posible interacción entre el músculo y el hueso durante la progresión de la enfermedad. Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente a la potencial interferencia muscular ósea sigue siendo en gran medida desconocido.

La mayoría de estudios sobre modelos animales de ELA, se centran en neurodegeneración, pero pocos estudios hablan sobre defectos musculares y menos aún sobre defectos óseos.

## **1.5 Inervación cardíaca. Posible relación con la enfermedad de ELA.**

El sistema cardiovascular (SCV) ha conseguido una independencia y una autorregulación gracias a que posee un sistema nervioso autónomo. A pesar de ello, el SNC y SNP siguen regulando algunas funciones sobre el sistema vascular periférico y sobre la capacidad cronotrópica (control sobre la frecuencia cardíaca), inotrópica (control sobre la contractibilidad cardíaca) y dromotrópica (control sobre conducción de impulsos eléctricos) del corazón. Este control se distribuye desde el hipotálamo, pasando por el tallo, columna vertebral y llegando hasta los nervios craneales y nervios autónomos periféricos, que hacen la sinapsis con el sistema de conducción y con el músculo cardíaco.

La relación entre patología neuronal y cardíaca es conocida desde 1947, describiéndose cambios electrocardiográficos. Por ejemplo, en 1953 Levin ya describió cambios sugestivos de Infarto Agudo de Miocardio (IAM) en paciente con hemorragia subaracnoidea.

Algunas alteraciones electrocardiográficas pueden ser explicadas dado que las enfermedades cerebrovasculares y cardiovasculares comparten factores de riesgo; es por eso que, en algunos pacientes con enfermedad neurológica pueden observarse alteraciones en el electrocardiograma.

La modulación que ejercen el SNC y el SNP permitiendo la autorregulación en el SCV, puede explicar que lesiones en el SNC o SNP puedan generar alteraciones cardíacas en un corazón sano o incluso empeorar su estado en un corazón ya enfermo. Entre las patologías relacionadas con alteraciones en el SCV se encuentran: hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraparenquimatosa y trauma craneoencefálico. Otras enfermedades que pueden estar relacionadas, pero en menor medida son: tumores cerebrales, meningoencefalitis, episodios convulsivos, esclerosis múltiple, hidrocefalia, lesiones raquímedulares y ELA. Así pues, la conjunción de enfermedad neurodegenerativa y alteración cardíaca, proporciona en un paciente un peor pronóstico que aquellos en los cuales esta conjunción no existe <sup>145</sup>.

- **Regulación neuronal cardiovascular.**

La inervación cardíaca es heterogénea, de tal manera que los nervios parasimpáticos y sus receptores muscarínicos se expresan en los tejidos auriculares y particularmente en los ganglios sinoauricular (SA) y auriculoventricular (AV); mientras que la inervación ventricular está dominada por neuronas simpáticas y sus receptores miocárdicos  $\beta$ -adrenérgicos; e incluso dentro del ventrículo izquierdo hay un gradiente de inervación simpática que se vuelve cada vez más escasa desde la base hasta el ápex<sup>146,147</sup>.

La eficacia de la acción de la bomba cardíaca está controlada por nervios simpáticos y parasimpáticos (vago). Para poder entender los cambios electrocardiográficos relacionados con enfermedades neurológicas, se necesita aclarar la fisiopatología del SNC y del SNP. Puede ser explicada en 2 puntos: rama aferente y rama eferente.

- **Rama Aferente.**

Transporta el potencial de acción desde los receptores periféricos al SNC (figura 10). Se trata de los nervios tanto simpáticos como parasimpáticos que envían información desde el corazón hasta el SNC. El principal nervio parasimpático es el nervio vago (par X). Los nervios aferentes se encuentran tanto en el mismo corazón, como en grandes vasos y arterias coronarias, ya que disponen de mecanorreceptores y quimiorreceptores, que informan al SNC del estado vascular.

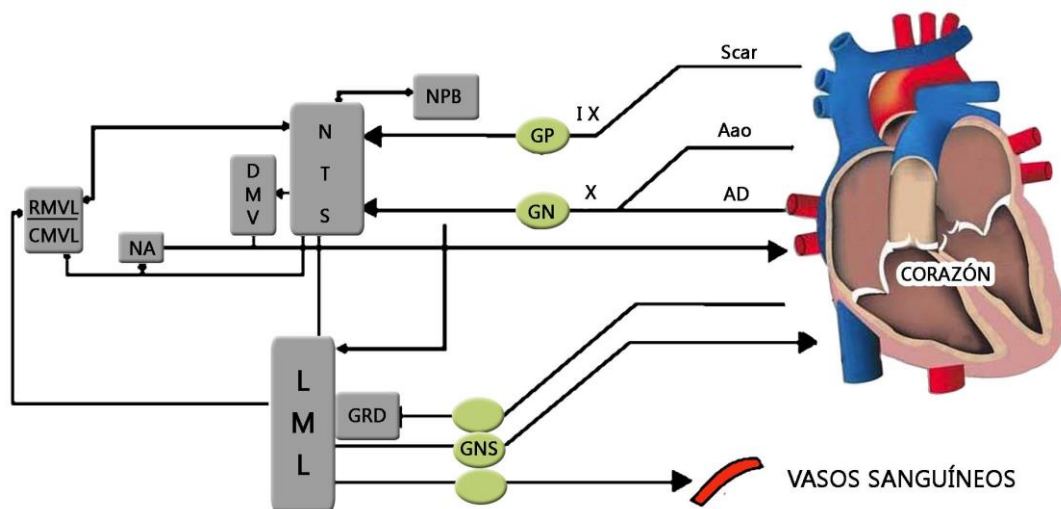


Figura 10. Rama eferente, regulación neuronal cardiovascular. Elaboración propia.

SCar: seno carotídeo. Aao: arco aórtico. AD: aurícula derecha. X: nervio vago. IX: nervio glossofaríngeo. GP: ganglio petroso. GN: ganglio nodoso. GNS: ganglios nervios simpáticos. NPB: núcleos complejo par braquial. GDR: ganglios raíz dorsal. NTS: núcleo del tracto solitario. IML: cordón intermediolateral. DMV: núcleo dorsal motor del X par (vago). NA: núcleo ambiguo. RMVL: vía rostral de médula ventrolateral. CMVL: vía caudal médula ventrolateral.

Hay dos tipos de mecanorreceptores auriculares, que están por toda la superficie auricular. Unos responden a la distensión auricular (volumen) y controlan la frecuencia cardíaca, y otros responden a la presión auricular ayudando a regular la presión arterial.

Los barorreceptores ventriculares se encuentran por toda la superficie ventricular, sobre todo en la pared posterior, respondiendo principalmente a la distensión de las paredes ventriculares. Al enviar los impulsos mediante el nervio vago (par X), induce bradicardia refleja, disminuyendo el inotropismo, lo cual provoca una disminución de la presión arterial sistémica. Por eso puede ser explicado el síncope durante el IAM ínfero-posterior<sup>148</sup>.

○ **Rama Eferente.**

Transporta el potencial de acción desde el SNC a las células efectoras situadas en las aurículas y en los ventrículos (figura 11). Éstas pueden ser simpáticas o parasimpáticas.

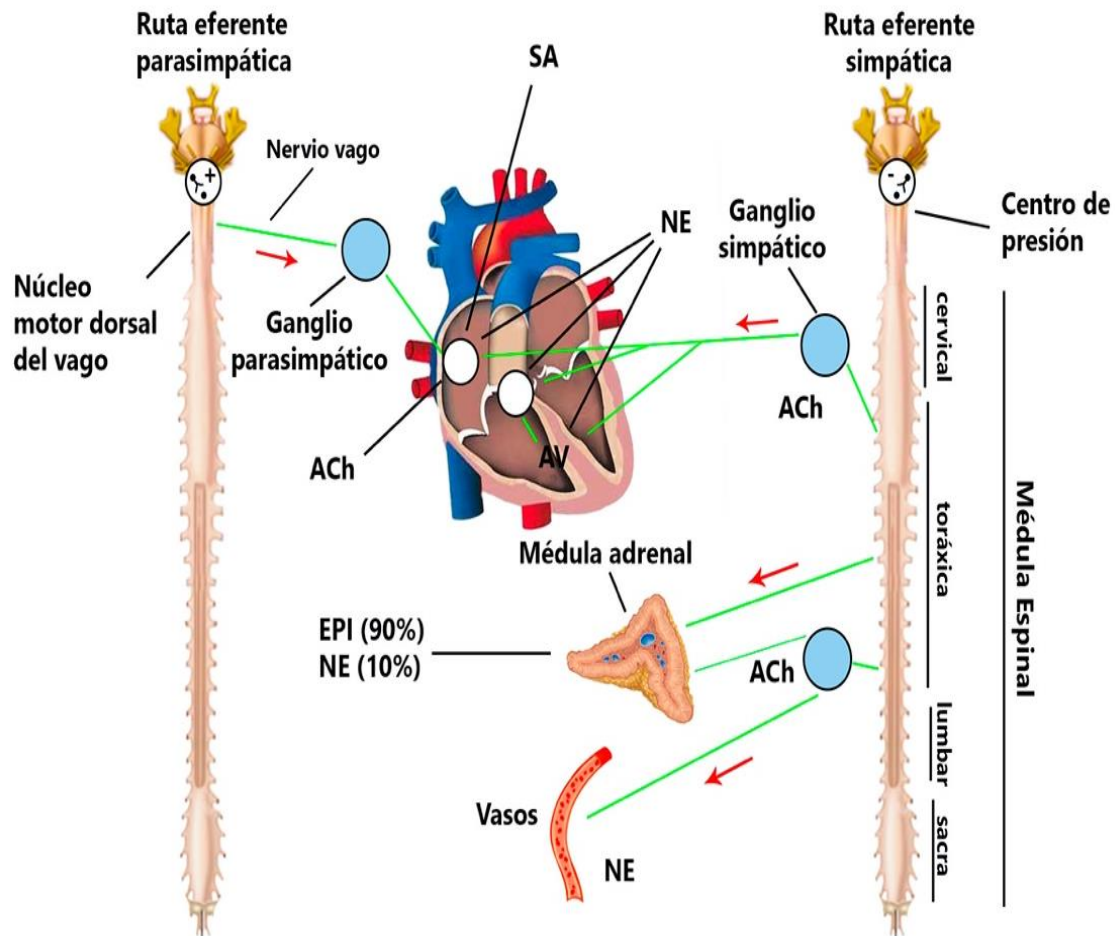


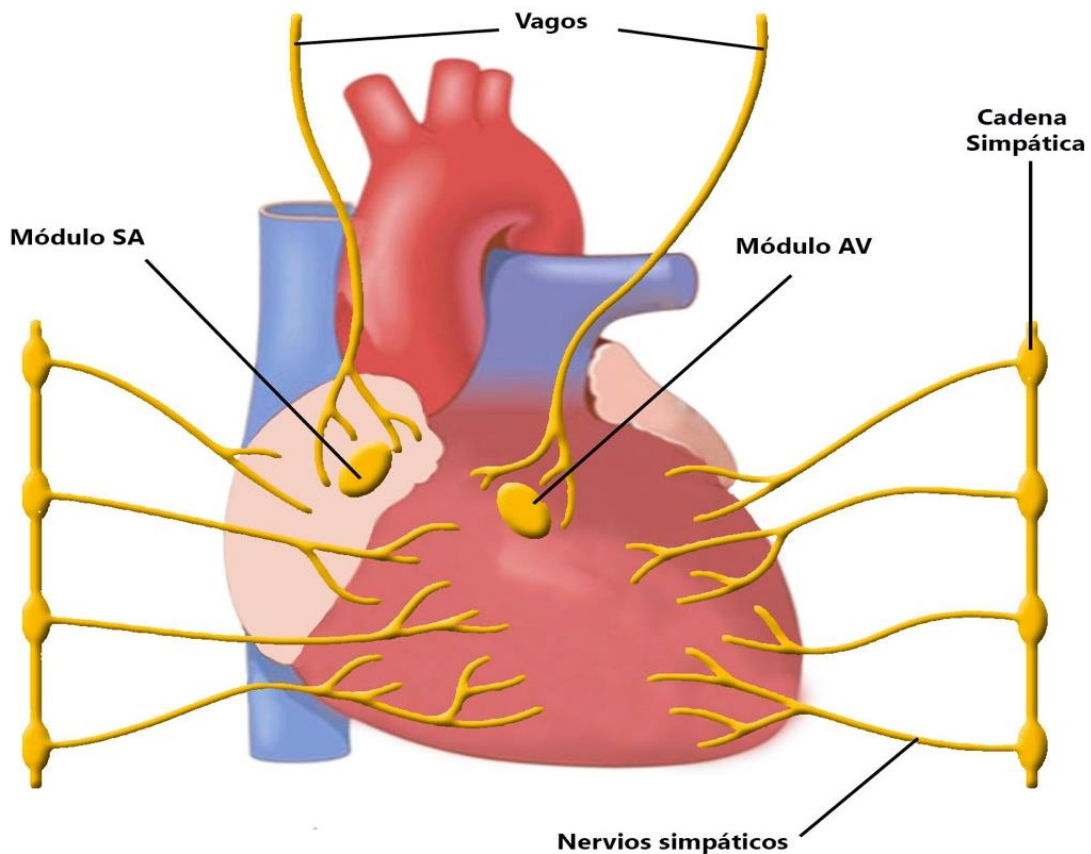
Figura 11. Rutas de las ramas eferentes simpática y parasimpática. Elaboración propia.

### ➤ **Simpática.**

Las fibras simpáticas inervan el nodo SA, el AV y el haz de His (figura 12). Estas fibras liberan noradrenalina, que aumentan la permeabilidad de las células efectoras a los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , actuando sobre el inotropismo y el cronotropismo, aumentando la contractilidad y la frecuencia cardíaca (y con ello la presión arterial).

La estimulación vehiculada por el ganglio estrellado derecho actúa sobre el nódulo sinusal, aumentando la frecuencia cardíaca<sup>145,148,149</sup>. Por otra parte, el estímulo del ganglio estrellado izquierdo provoca una disminución del tiempo refractario ventricular, lo que podría explicar las taquicardias supraventriculares y las fibrilaciones auriculares a causa del estrés, dosis elevadas de xantinas y tirotoxicosis, debido a la intervención de sistema simpático, y la mejoría obtenida con el bloqueo de estos ganglios de manera uni- o bilateral<sup>150,151</sup>.

Los efectos simpáticos adrenérgicos actúan sobre todo a nivel del nodo AV, observándose una disminución del tiempo necesario para transmitir impulso a través de este nodo (efecto dromotrópico positivo). Ello mejora la sincronía cardíaca y explica en parte el aumento de fuerza de la contracción ventricular en estados con tono simpático aumentado. Además, esta estimulación simpática mejora la contracción de los ventrículos, permitiendo que un mayor número de fibras se contraiga al unísono.



*Figura 12. Inervación de los nervios simpáticos y parasimpáticos en el corazón. Modificado de Tratado de Fisiología Médica, Guyton & Hall; 2001.*

➤ **Parasimpática.**

El neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático es la acetilcolina (ACh), que provoca la permeabilidad al potasio y permite un rápido escape de este fuera de las fibras de conducción, desencadenando que el tejido muscular sea mucho menos excitable.

La función más importante del sistema nervioso parasimpático sobre el corazón es controlar la frecuencia de los impulsos desde el nodo sinusal, prevaleciendo siempre éste sobre el tono simpático, provocando bradicardia (figura 12).

Las fibras vagales se distribuyen principalmente por las aurículas. Por eso su intervención sobre el nodo sinusal, haz de His y red de Purkinje, tiene un efecto tanto cronotrópico como dromotrópico negativo. De este modo se aumentan los tiempos de transmisión de los impulsos y disminuye la conducción, pudiendo llegar a provocar bloqueos aurículoventriculares completos, induciendo un ritmo de escape ventricular.

El equilibrio entre el sistema simpático y el parasimpático es vital para el corazón (figura 13), ya que, para una presión en aurícula dada, el gasto cardíaco aumenta con la estimulación simpática creciente, y disminuye al aumentar la estimulación parasimpática. Cuando este equilibrio falla, puede repercutir en el ritmo, en la conducción cardíaca y en la contractilidad (figura 14). Este fallo de equilibrios es lo que ocurre en algunas enfermedades neurológicas, en las que se pueden observar trastornos electrocardiográficos.

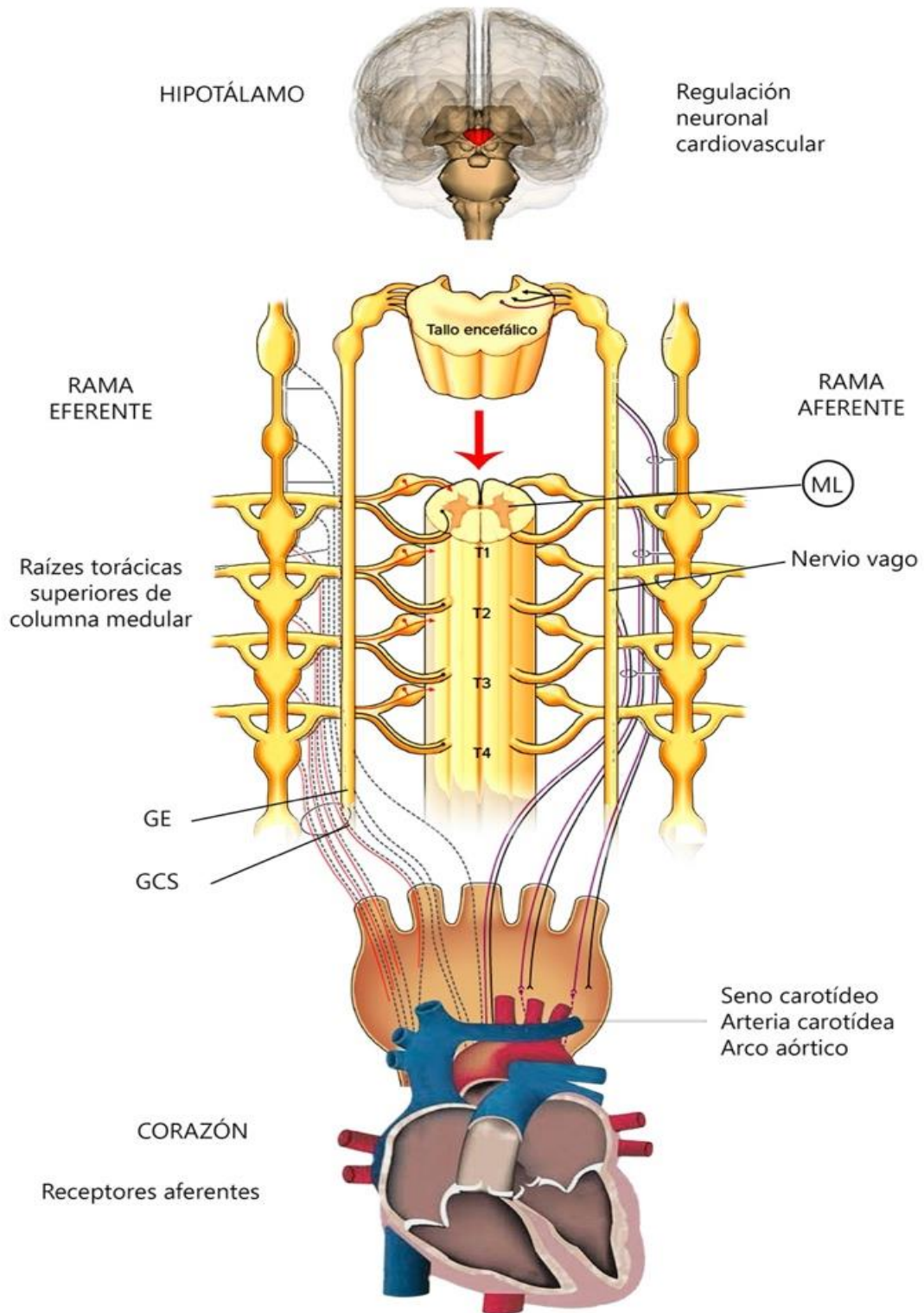


Figura 13. Vías aferentes y eferentes. Regulación neural cardiovascular. Elaboración propia.

**NPV:** núcleo paraventricular. **NA:** núcleo ambiguo. **DMV:** núcleo dorsal motor del vago. **NTS:** núcleo del tracto solitario. **IML:** columna intermediolateral. **GE:** ganglio estrellado. **GCS:** ganglio cervical superior.

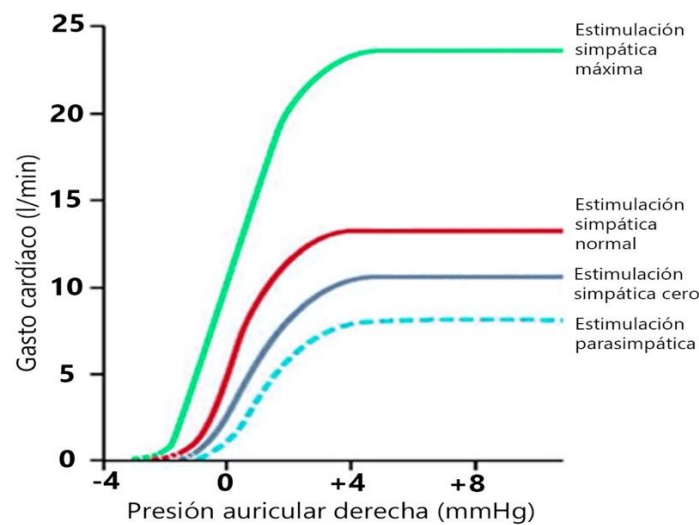


Figura 14. Efecto de los diferentes grados de estimulación simpática y parasimpática sobre la curva de gasto cardíaco. Fuente: Tratado de Fisiología Médica, Guyton & Hall; 2001.

- **Plexo cardíaco y corazón.**

Las fibras parasimpáticas vagales se dirigen hacia el ganglio estrellado y a partir de aquí acompañan a las fibras simpáticas eferentes cardíacas constituyendo el plexo cardíaco, situado en la base del corazón, y formado por las fibras vagales preganglionares y las fibras simpáticas post-ganglionares.

Los efectos cardíacos de la acción simpática y parasimpática sobre el corazón son interdependientes. Esto puede ser debido a la anatomía, ya que algunas terminaciones postganglionares simpáticas y parasimpáticas comparten vaina. Por lo que se entiende que, esta proximidad podría ejercer un efecto modificador de la liberación de un neurotransmisor sobre la liberación de otro; por ejemplo, la presencia de Ach inhibiendo la liberación de noradrenalina en la misma hendidura sináptica y la presencia de noradrenalina inhibiendo la liberación de Ach<sup>152</sup>.

La función cardíaca es sensible a cambios en la inervación del corazón. Por ejemplo, lo que ocurre en corazones trasplantados; existe una denervación total, dado que al no contar con un estímulo bradicardizante por el nervio vago, la frecuencia cardíaca es mas alta de lo habitual (100 lpm)<sup>153,154</sup>.

- **Cambios electrocardiográficos asociados con enfermedades neurológicas.**

Algunos trastornos electrocardiográficos pueden ser secundarios a enfermedades neurológicas y otros a enfermedades cardiovasculares. Esta coexistencia se estima que oscila entre el 5-60%, según la enfermedad neurológica. Por ejemplo, es sabido que es

mayor en pacientes con esclerosis múltiple (aunque esta asociación de ambas enfermedades aumenta con la edad, independientemente del evento neurológico sufrido) llegando a un 80% en pacientes mayores de 65 años.

Según estudios, existen diferentes mecanismos por los cuales se pueden encontrar alteraciones electrocardiográficas en pacientes con enfermedades neurológicas. En primer lugar, la coexistencia de enfermedad neurológica y cardíaca como la isquemia miocárdica. En segundo lugar, puede haber una isquemia difusa o IAM (sin haber tenido enfermedad coronaria previa) debido a la presencia de catecolaminas en el torrente sanguíneo secundarias a enfermedad neurológica. Y, en tercer lugar, puede hallarse alteraciones en la repolarización ventricular debido a la activación del sistema simpático, sin IAM previo.

Mediante autopsia ha podido demostrarse el compromiso miocárdico sin enfermedad cardíaca previa en pacientes con hemorragia subaracnoidea, mostrando pequeños focos de necrosis en miocardio lesionado, y pudiéndose deber a la exposición de catecolaminas. En modelos animales se observaron similares resultados al estimular directamente el hipotálamo y la ínsula cerebral con catecolaminas, apoyando así la teoría de niveles elevados de catecolaminas en zonas focales del miocardio (probablemente liberadas por terminaciones nerviosas simpáticas próximas a las zonas de necrosis).

Niveles elevados de catecolaminas en circulación o su presencia focal en miocardio, predispone a una vasoconstricción y a un aumento del consumo de oxígeno, pudiendo desencadenar arritmias. Además, las catecolaminas activan los canales de calcio, provocando una contracción miocárdica excesiva.

Debido a la heterogénea distribución regional de la inervación simpática del corazón, la estimulación del ganglio estrellado derecho se acompaña de elevación del segmento ST con ondas T negativas. Mientras que la estimulación simpática del ganglio estrellado izquierdo presenta infradesnivel del segmento ST con aumento en la amplitud de las ondas T y prolongación del intervalo QT. De la misma manera, existe la posibilidad de que enfermedades del SNC, al igual que del SNP, puedan producir alteraciones electrocardiográficas según el lado al que afecten.

La existencia de alteraciones en el electrocardiograma (ECG) en enfermedades neurológicas, son signos de mal pronóstico, aunque dichas alteraciones no son específicas de alguna enfermedad del SN.

Existen básicamente tres trastornos electrocardiográficos relacionados con enfermedades del SN;

- Trastornos de conducción.
- Trastornos en la repolarización.
- Trastornos en la frecuencia cardíaca o del ritmo.

- **Trastornos electrocardiográficos asociados a enfermedades neurológicas.**

- **Conducción de la repolarización.**

Tanto la hipertrofia ventricular izquierda como las ondas Q patológicas, son frecuentes en el grupo de edad de los pacientes con enfermedad neurodegenerativa. Sin embargo, como ya se ha comentado, en la hemorragia subaracnoidea se puede encontrar alteraciones en segmento ST, alteraciones en onda T y presencia de ondas Q sugestivas de IAM; además de ondas T invertidas similares a la isquemia de miocardio, pero con valores normales de enzimas cardíacas y sin enfermedad isquémica cardíaca.

Generalmente, estos cambios en el ECG son esporádicos, pudiendo revertir en semanas; a excepción de la prolongación del QT y las ondas U, que pueden ser indefinidas. Estas alteraciones no han podido ser explicadas por ahora, pero se baraja la posibilidad de que pueden ser secundarias a la alteración autonómica de los nervios que inervan el corazón.

- **Trastornos del ritmo.**

Es desconocida en la literatura la fisiopatología de los trastornos de ritmo ligados a enfermedad neurológica. Pueden presentarse en pacientes con isquemia o IAM con o sin enfermedad coronaria<sup>155</sup>.

La estimulación simpática excesiva derivada de un estrés neurológico, puede desencadenar la aparición de arritmias como la fibrilación auricular o taquicardia ventricular en corazones sin patología previa, debido a que provoca una repolarización desorganizada de las células miocárdicas. El control de estas arritmias, se puede lograr mediante la disminución del tono simpático con tratamiento farmacológico con bloqueo transitorio o permanente del ganglio estrellado<sup>150,151</sup>.

Todas estas alteraciones miocárdicas en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, podría desencadenar el fallecimiento del paciente, por lo que el tratamiento pasa por un diagnóstico rápido y una intervención con tratamiento específico.

### **1.5.1 Valoración cardíaca mediante electrocardiograma.**

El electrocardiograma (ECG), es una de las pruebas más frecuente para el estudio de la actividad eléctrica del corazón, al tratarse de un procedimiento no invasivo y sencillo de realizar. Mediante este método pueden diagnosticarse trastornos del ritmo, además de cambios agudos en la onda T, alteraciones hidroelectrolíticas (sobre todo hipocalcemia e hiperpotasemia), embolia pulmonar, y enfermedades cardiovasculares y del SNC.

Su función es representar la actividad eléctrica de las células del corazón en un papel milimetrado o formato digital latido a latido. Proporciona información sobre el ritmo, la regularidad de los latidos, el tamaño y posición de las aurículas, transmisión del impulso eléctrico a través de las aurículas (ondas P) y de los ventrículos (complejo QRS), así como también permite detectar anomalías de las transmisiones de este, realizando diferentes mediciones (intervalos PR, RR', ST, etc.), y considerando ritmo normal del corazón al ritmo sinusal que procede de la despolarización del nódulo sino auricular tal y como se muestra a continuación (figura 15)<sup>156</sup>.

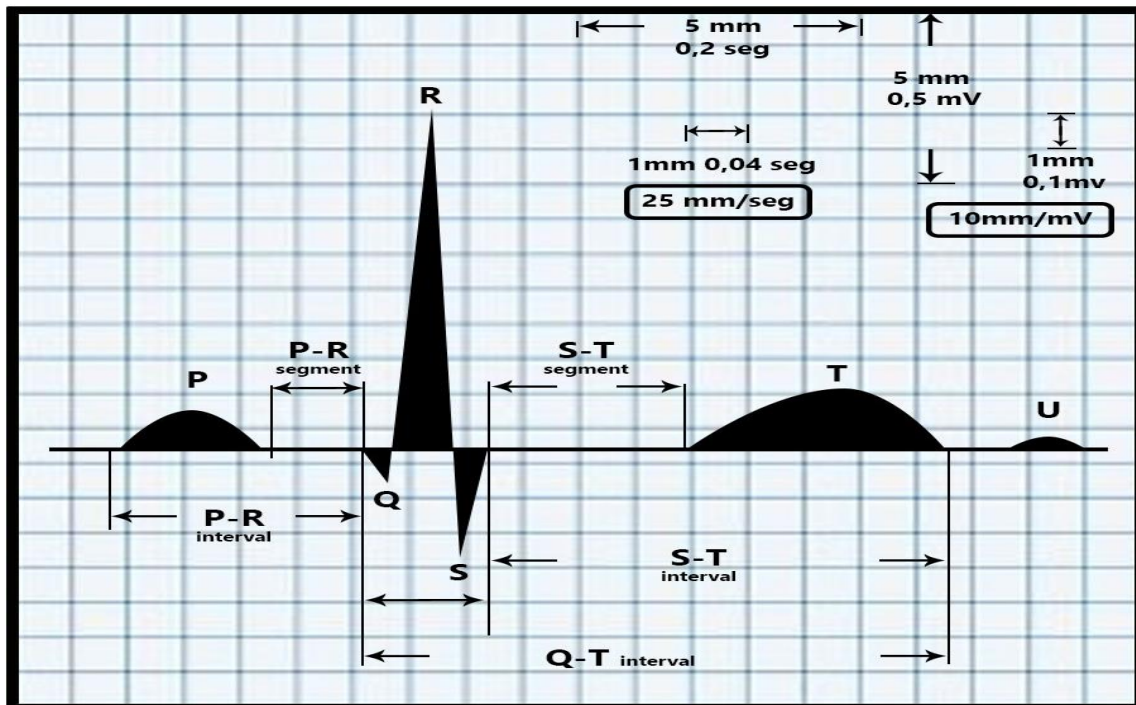


Figura 15. Ondas, segmentos e intervalos de un latido cardíaco sobre electrocardiografía en papel milimetrado. Elaboración propia.

La transmisión del impulso eléctrico a través de las células miocárdicas es lo que va a dar lugar a las diferentes ondas que aparecen en el ECG (figura 16);

- **La onda P**, primera onda reconocible en el ECG. Representa la despolarización auricular (activación eléctrica). Poco después, a los 0,15 – 0,20 s se realiza la repolarización auricular, quedando enmascarada por el QRS.
- **Intervalo P-Q o P-R**, es el tiempo que transcurre desde el comienzo de la onda P hasta el comienzo del complejo QRS. Se define como el periodo de inactividad eléctrica correspondiente al retraso fisiológico que sufre el estímulo en el nodo atrio ventricular. Su duración debe estar entre los 120 y 200 ms.
- **Complejo QRS**, estas ondas representan la despolarización ventricular (activación eléctrica). Su duración debe estar comprendida entre los 80 y 100 ms.
- **Segmento ST**, línea isoelectrica que transcurre desde el final del QRS hasta el inicio de la onda T.
- **Onda T**, corresponde a la repolarización ventricular, tras el segmento ST.
- **Intervalo Q-T**, se trata de la despolarización y repolarización ventricular; abarca desde el comienzo de la onda Q (o de la onda R cuando falta la onda Q) hasta el final de la onda T. Su duración está comprendida entre 320 y 400 ms.

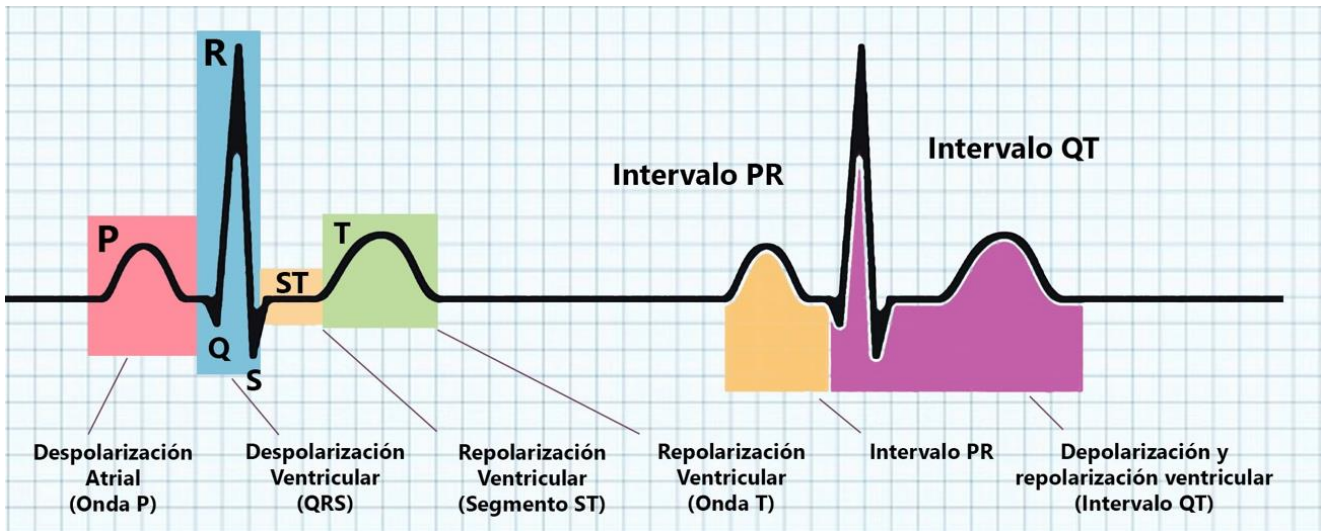


Figura 16. Ondas, segmentos e intervalos en un ECG sinusal y su significado. Elaboración propia.

Para ser considerado sinusal debe tener:

- Presencia de ondas P positivas en DI y en aVF, siendo negativas en aVR y en ocasiones en V1.
- Cada onda P debe ir seguida de complejo QRS.
- Intervalo R-R debe ser constante, de lo contrario podría significar la existencia de una arritmia.
- El segmento P-R debe ser constante e igual o mayor a 0,12s, de lo contrario podría indicar algún tipo de bloqueo.
- Una frecuencia cardíaca entre 60-100 lpm<sup>156</sup>.

### **1.5.2 Afectación cardíaca y ELA.**

Una de las características de la enfermedad de ELA son los trastornos relacionados con el sistema nervioso autónomo, la pérdida de los nervios noradrenérgicos simpáticos cardiacos, denervación noradrenérgica extracardíaca y por último la insuficiencia arterial<sup>157</sup> asociándose a la hipotensión ortostática (HO).

Además, estos pacientes pueden mostrar alteraciones tanto en sistema cardíaco parasimpático como simpático, con predominio de este último por degeneración de las neuronas parasimpáticas, causando crisis hipertensivas, muerte súbita<sup>158</sup> o

colapso cardiovascular. Puede que, en estadios más avanzados, este predominio simpático se pierda, consiguiendo el parasimpático una mayor actuación sobre el músculo cardíaco, lo que conlleva a una pérdida de la variabilidad de la frecuencia cardíaca y respuestas vasomotoras o bloqueo auriculoventricular<sup>157</sup>.

Electrocardiográficamente, se pueden observar alteraciones en ECG como la prolongación del segmento QT (un aumento de riesgo de muerte súbita<sup>159</sup>, alteraciones en segmento ST compatibles con IAM y Ondas T bifásicas<sup>160</sup>. Por el contrario, la pérdida noradrenérgica puede provocar HO, siendo ésta una manifestación clave de la disautonomía cardiovascular en enfermedades neurodegenerativas<sup>157</sup>.

Estudios recientes muestran la relación existente entre la disfunción de los canales iónicos y ELA, principalmente canales de Na<sup>+</sup> y canales de K<sup>+</sup>. Por otra parte, la modulación de la función del canal iónico se ha propuesto como el mecanismo por el que el riluzol ejerce los efectos neuroprotectores en pacientes con ELA<sup>14</sup>.

La muerte súbita cardíaca es definida como la muerte que ocurre de repente y de forma inesperada en pacientes no cardíacos, puede producirse con o sin antecedentes de enfermedad cardíaca. Este síndrome es conocido entre pacientes neurodegenerativos, ya que el corazón sufre alteraciones en el SN autónomo.

Entre los trastornos neuromusculares que se pueden hallar se encuentran aquellos con afectación mitocondrial, como es el ejemplo de ELA, que puede observarse en fases terminales de la enfermedad cuando el SNA actúa, activando en exceso el SNS, provocando prolongación del QT y QTc, aumentando el riesgo de muerte súbita<sup>161</sup>. Otra alteración que podría explicarlo es una alternancia de la onda T<sup>162</sup>.

## **1.6 Causas etiopatogénicas de ELA.**

Algunos estudios epidemiológicos han sugerido que los pacientes con ELA pueden haber estado expuestos a toxinas ambientales<sup>163</sup>. Las exposiciones a compuestos químicos agrícolas, metales pesados, disolventes, campos magnéticos, dieta, polvo/fibras/humo y actividad física han sido examinadas por posible asociación con ELA<sup>24,164</sup>. En la siguiente sección se analiza más a fondo el papel que cada uno de estos factores de riesgo.

- Actividad física; estudios hablan de que los atletas tienen mayor riesgo de ELA en comparación con la población general, sin embargo, no se ha podido demostrar que la realización de actividad física activa o pasiva tenga mayor susceptibilidad de desarrollar ELA. Por otro lado, existen varios genes (tales como: el factor neurotrófico ciliar, el factor inhibidor de la leucemia y el factor 2 de crecimiento del endotelio vascular) relacionados con el ejercicio que han sido reconocidos como posibles factores de riesgo para ELA. Los resultados inconsistentes de algunos estudios en cuanto al alto riesgo de padecer este trastorno entre atletas, invalidan cualquier asociación entre la actividad física y el riesgo de ELA. Por lo tanto, la actividad física no ha demostrado en sí ser una causa de ELA. Una posible explicación al alto riesgo de incidencia de ELA entre atletas implicaría perfiles genéticos. En otras palabras, un perfil genético alterado por factores exógenos que promueven la aptitud física, incrementa la susceptibilidad de padecer ELA. Esta idea se apoya en hallazgos de un perfil de riesgo vascular en pacientes y sus familiares<sup>44,165-168</sup>.

- Exposición a sustancias químicas y metales; la exposición a productos químicos como pesticidas, fertilizantes, herbicidas, insecticidas y formaldehído muestran una asociación con ELA. En un estudio prospectivo, se encontró que las personas que reportaron cuatro o más años de exposición a pesticidas/herbicidas podrían tener un mayor riesgo de adquirir ELA, pero no se encontró asociación entre la tasa de mortalidad y la cantidad de exposición. Este mismo estudio también encontró que, entre los individuos con largo período de exposición al formaldehído, la tasa de mortalidad en expuestos fue del doble en comparación con los no expuestos. Además, el formaldehído es un subproducto del humo del tabaco, lo que puede representar el 10-25% de la exposición al formaldehído en interiores<sup>163,169</sup>.

- Campos electromagnéticos y radiaciones; estudios de laboratorio han demostrado *in vitro* que las exposiciones a ondas electromagnéticas de muy baja frecuencia generan una mayor cantidad de oxígeno reactivo celular. *In vivo*, la misma exposición produce estrés oxidativo e inhibe las propiedades antioxidantes que podrían tener las células. Este daño oxidativo puede conducir a ELA, ya que el estrés oxidativo tiene un papel en la patogénesis de este trastorno. De hecho, los estudios han observado que los campos electromagnéticos causan rotura de las cadenas de ADN de las células cerebrales, llegando a la muerte celular (apoptosis y necrosis). Sin embargo, ninguno de los estudios

actuales ha encontrado una conexión concluyente entre la exposición al campo electromagnético, el estrés oxidativo sobre las neuronas y/o el desarrollo de ELA<sup>170-174</sup>.

- Tabaco; se ha descubierto que la inflamación, el estrés oxidativo y la neurotoxicidad por los metales pesados contenidos en los cigarrillos incrementa la probabilidad de desarrollar ELA. Sin embargo, no se ha podido relacionar con la duración o la intensidad del hábito tabáquico. Además, el formaldehído del humo exhalado se asocia con mayores tasas de mortalidad en pacientes con ELA, como ya se ha mencionado. Se cree que fumar es el factor de riesgo no genético más consistente. A pesar de todo ello, no se ha estudiado si el abandono del hábito tabáquico produce un efecto beneficioso en pacientes con ELA<sup>169,175,176</sup>.

- Dieta; algunos estudios indican que el consumo de alimentos con altos niveles de glutamato y grasa puede tener efectos adversos sobre los pacientes con ELA; mientras que los ácidos grasos Omega 3, la vitamina E y la fibra pueden tener un efecto defensivo. Según estudios, la sobreestimulación de los receptores de glutamato conduce a aumentar los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , que pueden iniciar un proceso de muerte neuronal selectiva similar al mecanismo que se observa en ELA. Por ejemplo, alimentos como tomates, champiñones, leche y queso son ricos en glutamato. Los ácidos grasos Omega 3 han sido conocidos por poseer características antiinflamatorias junto a la vitamina E, que reducen los riesgos asociados a ELA hasta un 60%<sup>47,164,177-179</sup>.

- Hereditarias: es inevitable hablar de un componente genético hereditario en un 5-10% de los casos, los denominados con ELA familiar o hereditario. Estudios genéticos han identificado la presencia de mutaciones en el gen que codifica la enzima citosólica superóxido dismutasa (SOD1) fijadora de cobre y cinc, y que serían la causa de una forma de ELA familiar. Otra proteína relacionada con ELA familiar es la proteína TAR vinculante al DNA (TDP-43). Además, se conoce también la implicación de la proteína TAR, FUS/TLS, que como ya se ha mencionado en el punto 1.3, están implicadas alrededor de un 4% de los casos de ELA familiar.

Otros mecanismos patogénicos que se plantean son:

- Acción destructiva de moléculas oxidantes.
- Mecanismos inmunológicos, de modo que se vincule con una actividad autoinmune.
- Desarrollo de infecciones virales crónicas.

- Desarrollo de infecciones fúngicas.
- Defecto primario en la actividad de los factores tróficos que son los responsables de la homeostasis de esas neuronas.

Es también necesario mencionar que existen autores cuya convicción los lleva a sugerir la eventual acción de factores ambientales como causa o, al menos como desencadenantes de la alteración. El descubrimiento en nuestra época de alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo de la enfermedad en una pequeña proporción de pacientes, ha permitido obtener mayores datos en cuanto a los mecanismos oxidativos y tóxicos que parecen jugar un rol de valor en su presentación y desarrollo<sup>180</sup>.

### ❖ **Mecanismo molecular.**

La causa más frecuente de ELA familiar es una mutación del gen que codifica la enzima antioxidante superóxido dismutasa 1 (SOD1)<sup>181</sup>. Cuando esta enzima muta, tiene una inestabilidad estructural causando un repliegue anómalo, lo cual puede conducir a una agregación de las motoneuronas dentro del SNC<sup>182</sup>. Se han propuesto varias hipótesis con respecto al mecanismo subyacente de acción de la SOD mutada y la posterior neurodegeneración en ELA. Las hipótesis propuestas más relevantes para la patogénesis de ELA incluyen: la excitotoxicidad del glutamato<sup>175</sup>, anomalías estructurales y funcionales de las mitocondrias, alteración de la estructura axonal o defectos de transporte y el estrés oxidativo mediado por radicales libres<sup>183,184</sup> (figura 17). Aunque estos mecanismos juegan un papel crítico en la neurodegeneración, todos ellos son considerados como eventos secundarios de las causas responsables del inicio de la enfermedad.

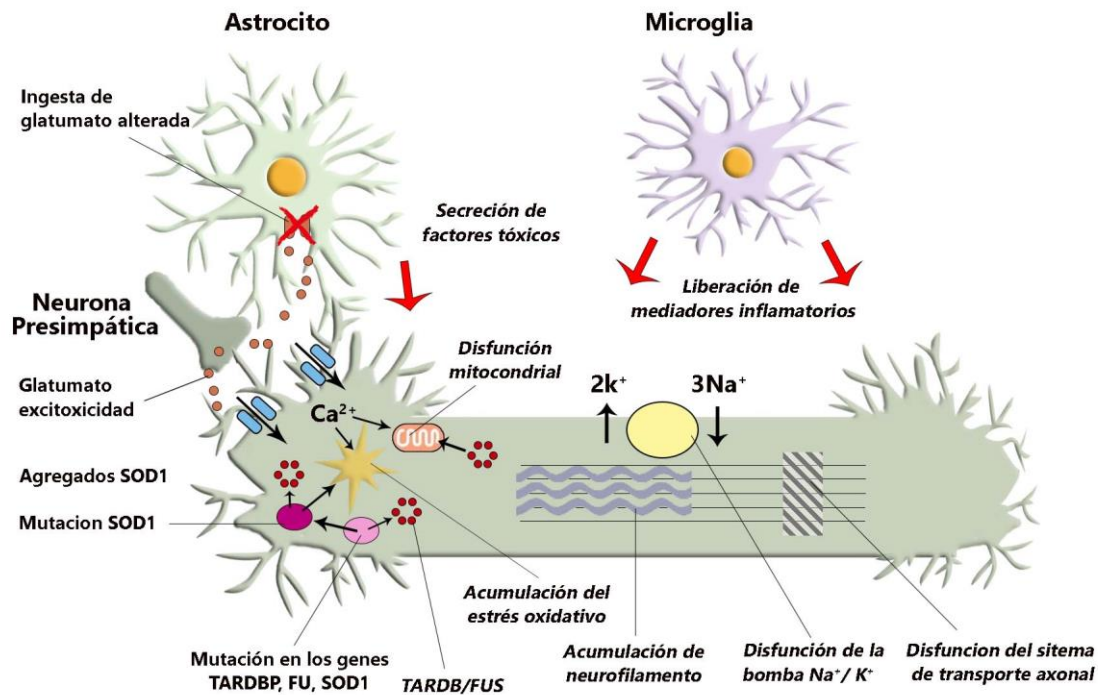


Figura 17. Procesos celulares y moleculares que median la neurodegeneración en ELA. Modificado de Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet. 2011 Mar 12;377(9769):942-55. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61156-7.

Al comparar las tasas de supervivencia de los pacientes con comorbilidades de salud mental, se observó que los pacientes que padecían Parkinson y ELA tuvieron una progresión más lenta de su enfermedad y un mayor tiempo de supervivencia ( $P = 0,03$ ). En este sentido, es posible que el desarrollo patológico de la enfermedad de Parkinson (EP) pueda ralentizar el inicio de los efectos de ELA al alterar la velocidad de la degeneración nerviosa y la progresión de la enfermedad.

Del mismo modo, también es posible que la administración de L-DOPA o la disminución de los niveles de dopamina endógena pudieran ofrecer un efecto antioxidante protector en aquellos pacientes susceptibles de padecer ELA<sup>185</sup>, similar al observado en múltiples estudios que comparan la incidencia de ELA y el consumo de vitamina E<sup>186</sup>.

### ➤ Excitotoxicidad del glutamato.

Uno de los neurotransmisores implicados en la transmisión de los impulsos nerviosos en SNC es el glutamato<sup>172</sup>. Este neurotransmisor se sintetiza en el terminal presináptico (figura 18), y es captado por las vesículas sinápticas.

Durante la neurotransmisión normal, el glutamato se libera en la hendidura sináptica, donde activa los receptores postsinápticos. Este proceso de liberación y eliminación continuo de glutamato mantiene el equilibrio en el gradiente de concentración y evita el daño neuronal excitotóxico<sup>187</sup>.

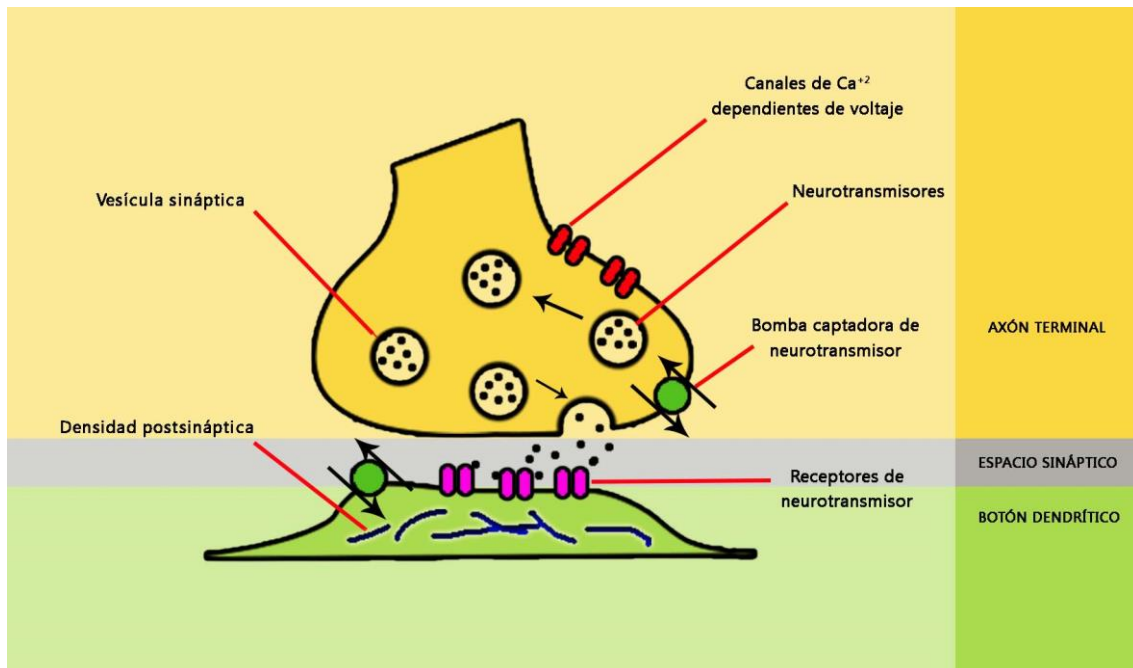


Figura 18. Esquema de la sinapsis. Modificado de Arias HR. *Marine Toxins Targeting Ion Channels. Mar Drugs.* 2006;4(3):37-69. Published 2006 Apr 6.

Se ha visto en pacientes con ELA y en modelos de ratón transgénico SOD1, la presencia de un transportador de glutamato astroglial reducido EAAT2. Esta situación provoca una reacción en cadena, ya que, debido a esto existe un exceso de glutamato extracelular<sup>188</sup>, lo que lleva a producir una sobreestimulación sobre los receptores de membrana del glutamato. Este conjunto de hechos causa una excesiva afluencia de  $Ca^{2+}$ , saturación de las neuronas motoras, y la iniciación de varios procesos de apoptosis. Todos ellos son procesos conocidos en la fisiopatología tanto de ELA familiar como esporádica<sup>189,190</sup>.

Por lo que la excitotoxicidad del glutamato se considera que contribuye a la neurodegeneración ya sea a través de la activación de las vías enzimáticas dependientes de  $Ca^{2+}$  mediante el aumento de la afluencia de iones sodio ( $Na^+$ ) y  $Ca^{2+}$  o por la generación de radicales libres<sup>191</sup>.

➤ **Alteraciones estructurales y funcionales de las mitocondrias.**

Las mitocondrias son orgánulos que tienen un papel importante en procesos vitales como la producción de energía intracelular, la respiración celular, la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y el control de la apoptosis, por lo que la alteración de su estructura dificulta sus acciones, contribuyendo a la patogénesis de ELA (figura19).

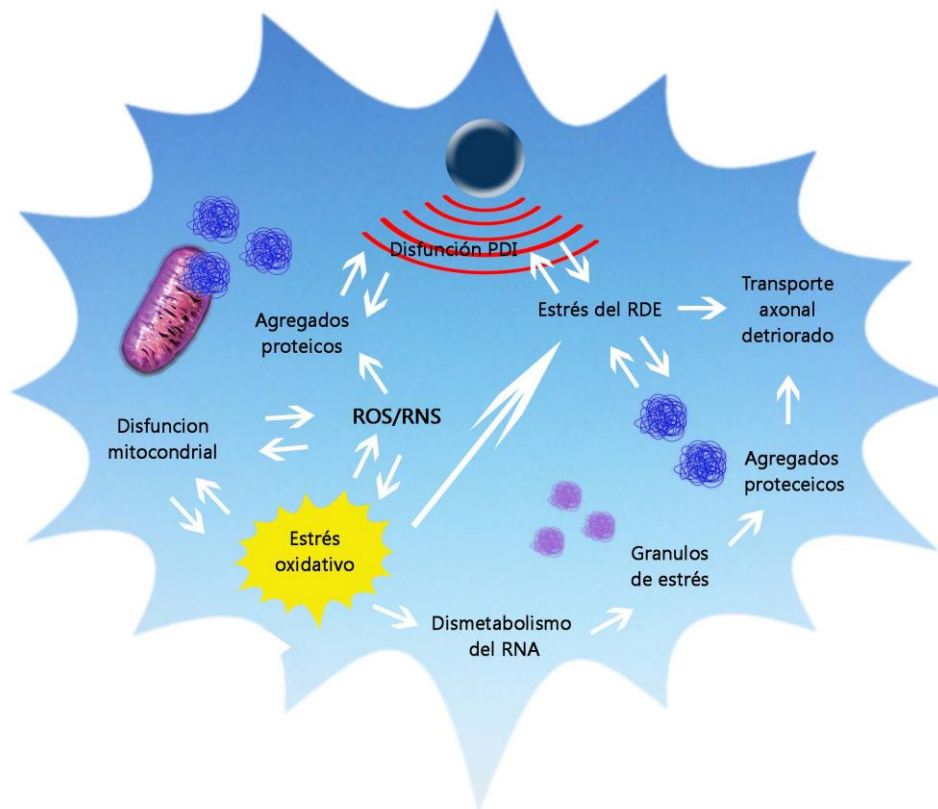


Figura 19. Daño mitocondrial en ELA. Elaboración propia.

Se comprobó que los pacientes con ELA tenían defectos funcionales y alteraciones en: la morfología mitocondrial, axones proximales del músculo esquelético y en las neuronas motoras espinales<sup>192,193</sup>.

En la médula espinal de pacientes con ELA, la SOD1 mutada se deposita en la matriz y en la membrana externa de las mitocondrias. Este aumento de SOD1 mutado, se considera la razón principal por la cual lleva a un déficit de todas las funciones en las cuales está implicada la mitocondria, como son: la producción de ATP, de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , del transporte axonal de las mitocondrias y del desencadenamiento de procesos apoptóticos, debido a un aumento de radicales libres

de ROS/RNS que se han formado. Todo ello conlleva a una disfunción mitocondrial<sup>194</sup>, que termina con la pérdida neuronal.

Además, la alteración del transporte axonal afecta al proceso de degradación y reciclado de las mitocondrias anormales, aumentando así la cantidad de mitocondrias disfuncionales en los axones distales y acumulación de neurofilamentos, conduciendo de este modo a la muerte de la motoneurona<sup>195,196</sup>.

El sistema de fosforilación oxidativa está constituido por diversos transportadores de electrones, entre las que se encuentran  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , gracias a las cuales se obtiene energía mediante ATP en la mitocondria.

En este caso, es de gran importancia la nicotinamida ribósido ( $\text{NAD}^+$ ), ya que, ha surgido como un cofactor vital que puede reconfigurar el metabolismo, activar las sirtuinas y mantener la funcionalidad mitocondrial a través de diversos mecanismos<sup>197</sup>. Además, tiene una función determinante en la reparación del ADN, desacetilación de proteínas, resistencia al estrés oxidativo y muerte celular. Por todo ello, la síntesis de  $\text{NAD}^+$  puede sugerirse como una diana terapéutica para enfermedades degenerativas, debido a que ya ha sido demostrado que precursores de  $\text{NAD}^+$  como puede ser la nicotinamida ribósido o NR, ralentizan el envejecimiento, prolongan la vida útil de levaduras y protegen axones de la degeneración en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas<sup>198</sup>.

A medida que aumenta la prevalencia y la morbilidad de enfermedades cardiovasculares, metabólicas o neurodegenerativas, ha surgido la necesidad de una rápida utilización de precursores de  $\text{NAD}^+$ , como NR, con uso terapéutico y un mayor establecimiento de su disponibilidad como suplemento nutricional<sup>199</sup>.

### ➤ **Radicales de estrés oxidativo.**

Se puede definir el término radical libre (RL) como toda especie química con capacidad de existencia independiente con un electrón desapareado. Este electrón ocupa un orbital atómico por él mismo, lo que le confiere una alta inestabilidad, reactividad y una vida muy corta, haciéndolo capaz de combinarse inespecíficamente con la mayoría de moléculas celulares, y variando su estructura y por tanto su función en el organismo<sup>200</sup>

Éstos radicales son generados por algunas reacciones fisiológicas del organismo, como la respiración celular mitocondrial, producto de la fagocitosis a causa de las defensas, quimiotaxis o la regulación de la síntesis de catecolaminas suprarrenales<sup>200</sup>.

Los RL se forman durante el proceso de respiración celular (transformación del oxígeno en energía), donde las células metabolizan la mayor parte del oxígeno produciendo H<sub>2</sub>O. Pero existe una pequeña proporción que forman intermediarios altamente tóxicos (entorno al 2%), como en la unión del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) que, en caso de no ser eliminados, se acumulan causando graves daños a las estructuras celulares. Debido a esto, en situaciones de aumento de la demanda de oxígeno (inflamación, aumento de la temperatura, ejercicio) aumentará la síntesis de ROS. En contraposición, los leucocitos polimorfonucleares, los monocitos, macrófagos y eosinófilos poseen rutas metabólicas para sintetizar este tipo de especies. Estos, los liberan como defensa para provocar daño a agentes infecciosos cuando hay procesos inflamatorios, como una parte de la defensa del organismo<sup>201</sup>.

Se entiende por estrés oxidativo, un desequilibrio entre agentes oxidantes y las defensas antioxidantes tanto endógenas como exógenas, produciendo así una serie de variaciones de sustancias en el organismo capaces de producir daño o muerte celular. Los RL podemos dividirlos en dos grupos según de la molécula de la que deriven: especies reactivas del oxígeno o ROS y especies reactivas del nitrógeno o RNS<sup>182</sup>. Ambos tipos pueden producirse por diversos factores como la respiración aeróbica, la invasión de una sustancia xenobiótica o por varios factores ambientales. Como consecuencia de este proceso se produce una variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula con alteraciones en la estructura de las proteínas, lípidos, ADN, etc.<sup>202,203</sup> además de ser una de las principales causas del envejecimiento celular.

En contraposición, para disminuir el impacto del estrés oxidativo en el organismo, el propio cuerpo lleva inherente un sistema de defensa formado por antioxidantes, encargados de contrarrestar los efectos del ROS/RNS<sup>202,204</sup>. Esta barrera de defensa facilita el uso del oxígeno por parte de las mitocondrias, reduciendo así los efectos del estrés oxidativo y previniendo las enfermedades producidas por el mismo. Se clasifican en endógenas (se forman en el propio organismo) y exógenas (incorporados a través de la dieta). Las defensas endógenas a su vez son clasificadas

en componentes enzimáticos como la SOD, la catalasa y la glutatión peroxidasa; y componentes no enzimáticos, entre los que destaca el glutatión<sup>205</sup>.

- **Antioxidantes enzimáticos:** tienen capacidad protectora frente al daño oxidativo, entre ellos se encuentran <sup>204</sup>:
  - Superóxido dismutasa (SOD), ampliamente distribuida en el organismo, formada por enzimas metaloides (utilizan metales como cofactores): Cu-SOD y Zn-SOD (con cobre y cinc y que se encuentran en el citosol y espacio intermembranoso mitocondrial), Mn-SOD (con manganeso, localizado en la matriz mitocondrial) y Fe-SOD (con hierro y que se encuentra en el espacio periplasmático de la *E. coli*). La principal función es la protección contra el anión superóxido, catalizando la dismutación de superóxido a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
  - Las catalasas (CAT), se encuentra ampliamente distribuida por el organismo, con altas concentraciones en el hígado y en el riñón, pero bajas en tejido conectivo y epitelios. Catalizan la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Actúan junto con otra enzima importante antioxidante, la SOD.
  - La glutatión peroxidasa (GPx), localizada en citosol y lisosomas. Utilizada para la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en alcoholes con la ayuda del glutatión (GSH). Además, también se utiliza como mediadora en algunas enfermedades para regular la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- **Antioxidantes no enzimáticos,** principalmente encontramos el glutatión reducido, un tripéptido considerado como uno de los mayores antioxidantes utilizados para la eliminación de ROS a nivel celular.

A parte de las defensas propias antioxidantes que se encuentra en las células, también se encuentran las exógenas, aportadas por la propia dieta, entre las que se encuentran las siguientes:

- **Vitaminas:** Vit. A (aunque puede ser formada en el hígado), Vit. C (o ácido ascórbico) o Vit. E (es el antioxidante natural más importante en la reducción de ROS/RNS, además, hay indicios de que la presencia de una concentración correcta de vitamina E ayuda a desacelerar el avance de la enfermedad)<sup>177</sup>.

- Minerales: selenio y zinc, que son los minerales de mayor potencial antioxidante y se encargan del mantenimiento de la actividad enzimática. El zinc es un inhibidor de NADPH y se encarga de la conversión del O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Polifenoles: que tienen gran capacidad antioxidante gracias a su disposición estructural. Su importancia viene dada por la capacidad antagonista y eliminadora de ROS y RNS<sup>173,204,206</sup>.

### ➤ **Polifenoles.**

Los polifenoles son el grupo más extenso de elementos no energéticos presentes en los alimentos vegetales. Se pueden definir como compuestos heterogéneos de moléculas que presentan uno o varios anillos fenólicos, producto del metabolismo secundario de las plantas; y en función del número de anillos fenólicos que presenten, se pueden diferenciar varias clases y subclases<sup>207</sup>.

Por sus características físico-químicas poseen la capacidad de modular la actividad de diferentes enzimas e interferir en mecanismos de señalización de diversos procesos en la célula, lo que les permite participar en el equilibrio de reducción-oxidación (REDOX) celular, siendo la capacidad antioxidante su función principal<sup>207</sup>. Se pueden clasificar en: flavonoides y no flavonoides (figura 20).

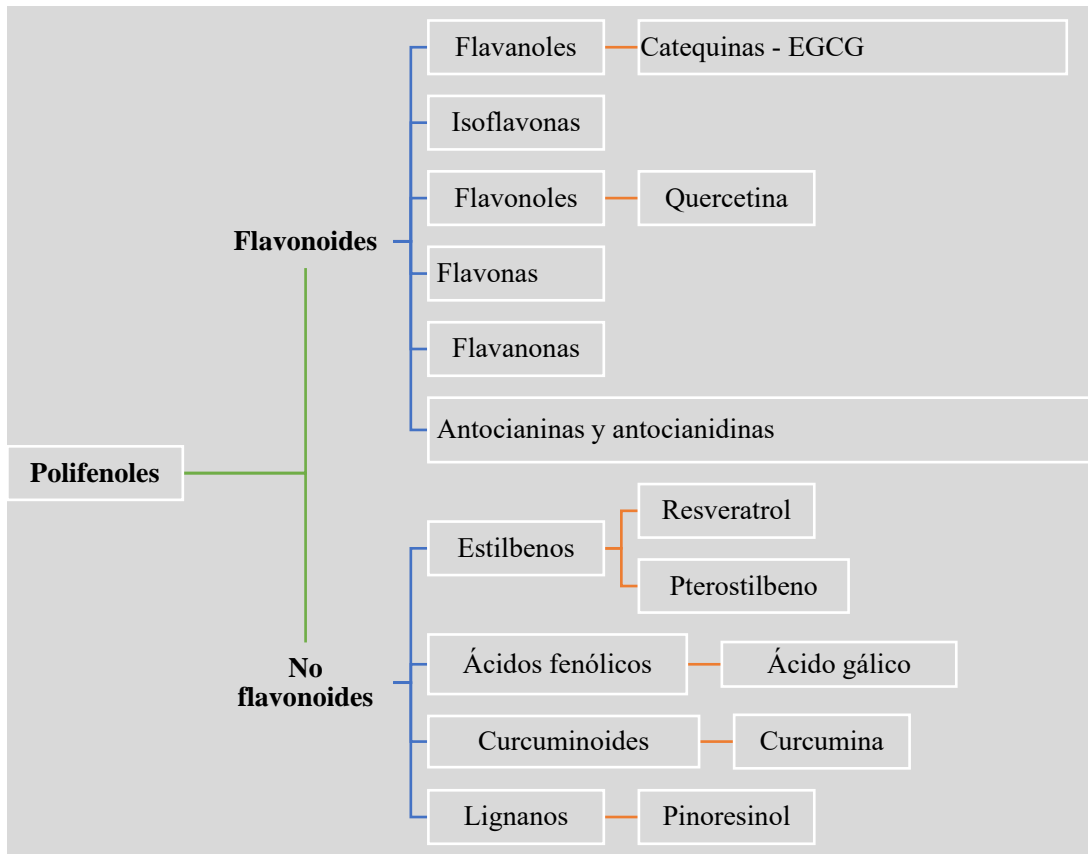


Figura 20. Clasificación de los principales polifenoles. Elaboración propia.

- **Flavonoides:** es la subclase más abundante en el reino vegetal. Se trata de compuestos de bajo peso molecular, que se encuentran en mayor medida como glucósidos. Se clasifican en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico y de la posición del anillo fenilo<sup>207,208</sup>.
  - Flavonoles: estos compuestos están presentes en muchas frutas, principalmente en la piel de las uvas, manzana y arándanos. El más conocido es la epilocatequina-3-galato (EGCG), que se encuentra en el té verde.
  - Flavonas y flavonoles: son el grupo más común. Las flavonas pueden encontrarse en la uva o la miel; mientras que los flavonoles, pueden encontrarse en una amplia variedad de frutas y verduras.
  - Flavanonas y flavanonoles: la principal molécula de esta familia es el taxifolin, presente en los cítricos.
  - Isoflavonas: se encuentran principalmente en las legumbres y en el grano de la soja, además de en otros alimentos como el trébol rojo.
  - Proantocianidinas y taninos: pueden encontrarse en arándanos, semillas y la piel de las uvas, la corteza de pino y otras plantas.

- Antocianidinas y antocianinas: son el principal componente de los pigmentos rojos, azules y morados de los pétalos de las flores, frutas y vegetales, además de encontrarse en algunos tipos de grano como el arroz negro.
- Chalconas: pueden encontrarse en frutas como las manzanas, el lúpulo o la cerveza.
- Neoflavonoides: no se encuentran a menudo en plantas comestibles.
  
- **No flavonoides**: los más importantes en la dieta son los estilbenos, los ácidos fenólicos y los curcuminoides<sup>208,209</sup>.
  - Ácidos fenólicos: se encuentran principalmente en granos y semillas (salvado). Destaca el ácido gálico, presente en las frutas ácidas, vino tinto, las bayas y la col roja.
  - Curcuminoides: destaca la curcumina, responsable del color amarillo de la molécula presente en la especia del curry, y es la principal molécula de este grupo. Tiene efectos protectores frente al cáncer de mama y piel en modelos de animales<sup>210</sup>.
  - Amidas polifenólicas: existen unas moléculas que se encuentran en plantas comestibles que son de relevancia: los capsaicinoides (responsables del picante de los chilis), y la capsaicina (que posee un gran poder antioxidante además de efectos antiinflamatorios).
  - Estilbenos: el resveratrol (RESV) puede obtenerse de alimentos y bebidas derivadas de la uva, moras y cacahuetes. Entre sus funciones, inhibe la apoptosis, estrés oxidativo, peroxidación lipídica, además, inhibe del daño en el ADN, disfunción mitocondrial, deterioro cognitivo, infarto cerebral y edema. Las funciones motoras están asociadas con la actividad antistroke del RESV; por otro lado, tiene un efecto anti-amiloidogénico, y retrasa el deterioro cognitivo mediante la activación de SIRT1 y AMPK, además de mostrar también una actividad protectora contra la enfermedad de Alzheimer y trastornos de neurodegeneración dependientes de la edad por inhibición de la formación de fibrillas. Como por ejemplo publicó Gerhard, E y cols. (2011), el RESV extendía la vida útil y retrasaba el empeoramiento de la actividad locomotora en trastornos neurodegenerativos como Parkinson o la enfermedad de Huntington en ratones

knockout<sup>211</sup>. Más tarde otro estudio corroboró que el RESV prolonga la vida útil y mejora la función de la motoneurona en SOD1 en ratones con ELA<sup>212</sup>.

El RESV, también ejerce un efecto protector contra enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, aterosclerosis, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio<sup>213</sup>.

Un Análogo del RESV es el pterostilbeno (PTER), que son las moléculas más representativas de este grupo y se trata de un estilbeno aislado entre otros de los arándanos, ejerciendo efectos protectores contra el estrés oxidativo de las mitocondrias.

El PTER es más efectivo que el RESV (60-100 veces)<sup>214</sup> debido, entre otras causas a que el PTER tiene una vida media más larga que el RESV y mayor biodisponibilidad. La razón de esta mayor biodisponibilidad se debe a que 2 grupos hidroxilo son metoxilados, dejando solo el 4'-hidroxilo disponible para conjugación y eliminación, siendo más estable. Para finalizar, el PTER no presenta toxicidad sistémica en estudio con ratones.

- Otros polifenoles: los lignanos son polifenoles presentes en las semillas de calabaza el brócoli o la soja.

## **1.7 Efecto en ELA de una intervención con pterostilbeno y nicotinamida ribósido.**

### **1.7.1 Pterostilbeno.**

Como se acaba de explicar, el RESV es uno de los polifenoles más estudiado. Recientemente se ha estudiado su posible utilización en la terapia de ELA<sup>212</sup>. En dicho estudio se reveló que los efectos protectores del RESV se asocian con un incremento en la expresión y activación de SIRT-1 y de la AMPK (proteína quinasa activada) en la parte ventral de la medula espinal. Ambos mediadores promovieron la normalización del flujo autofágico y, de forma más importante, incrementaron la biogénesis mitocondrial en los ratones SOD1-G93A. Sin embargo, sus efectos beneficiosos están fuertemente limitados por su baja biodisponibilidad<sup>215</sup>.

Por ello se propone la utilización de otro estilbeno como el PTER (figura 21), cuya vida media en el torrente sanguíneo es unas 5 veces superior al RESV<sup>216</sup>, y que en modelo animal ha mostrado disminución de estrés oxidativo e inflamación<sup>217</sup>. Además, el PTER se ha visto que no es tóxico a grandes dosis en ratones<sup>218</sup>, ni en estudios con seres humanos a dosis de 250mg al día<sup>219</sup>.

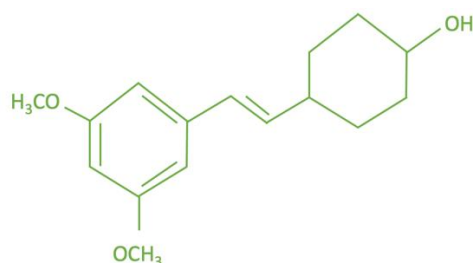


Figura 21. Estructura química pterostilbeno. Fuente: elaboración propia.

### 1.7.2 Nicotinamida ribósido.

En cuanto a la Nicotinamida ribósido (figura 22), se han descubierto diferentes propiedades beneficiosas para la salud. En primer lugar, destaca el hecho de que aumenta eficazmente los niveles intracelulares y mitocondriales de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>), que se convierte en NADH (poder reductor) en las células y los tejidos.

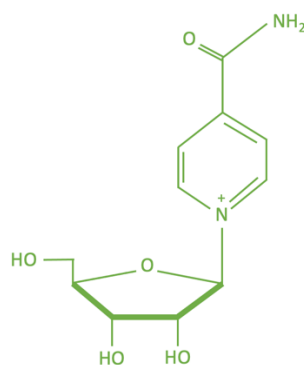


Figura 22. Estructura química de nicotinamida ribósido. Fuente: elaboración propia.

El NAD<sup>+</sup> es un factor indispensable en el metabolismo de la ATP. Actúa como un co-sustrato indispensable de las enzimas sirtuinas. También mejora la sensibilidad a la insulina evitando la aparición de diabetes mellitus y mejorando la utilización de la energía. En relación con estos mecanismos y asociándolo al objetivo de nuestro estudio, la nicotinamida se muestra como un potente antienvjecimiento (de hecho, se ha visto cómo sus niveles con la edad bajan

llamativamente en *C. elegans*, ratones y seres humanos), aumentando de un modo muy eficaz la actividad de las SIRT1 y SIRT3, lo que se traduce en una mejora de las funciones metabólicas vinculadas a las mitocondrias y, por tanto, la combustión de las grasas y las capacidades oxidativas de las células.

De hecho, se ha visto que previene la senescencia de células madre muscular, neuronal y de melanocitos<sup>220</sup>, observándose también recientemente un aumento de la regeneración muscular en los ratones después de tratarlos con ribósido de nicotinamida, lo que conduce a la idea de que podría mejorar la regeneración de órganos tales como el hígado, riñón y corazón<sup>221</sup>.

2

**Hipótesis y objetivos.**



## **2 Hipótesis y objetivos.**

---

Habida cuenta de la importancia que la oxidación tiene sobre el desarrollo de ELA, y teniendo constancia de la repercusión que puede tener dicha enfermedad sobre el sistema musculoesquelético y SN, se plantea las siguientes hipótesis y objetivos a investigar.

### **2.1 Hipótesis.**

Basándonos en el análisis de los datos científicos publicados en los últimos años y expuestos en el marco teórico, las hipótesis de trabajo son las siguientes:

1. Una enfermedad neurodegenerativa como es el caso de la ELA que inicialmente debuta con alteraciones neuromusculares, puede también condicionar un deterioro de la calidad ósea.
2. Los pacientes de enfermedades neurodegenerativas como es el caso de pacientes con ELA, pueden presentar anomalías electrocardiográficas.
3. La administración de la combinación de PTER y Nicotinamida ribósido (en adelante designado como EH301, como denominación comercial de la combinación), puede ayudar a frenar el avance de la enfermedad a nivel motor mejorando la función muscular.

### **2.2 Objetivos principales y secundarios.**

#### **Estudio 1.**

**Objetivo principal:** realizar un estudio descriptivo de la calidad ósea de pacientes con ELA mediante QUS, comparándolos con una población control de rango de edad similar.

#### **Objetivos secundarios:**

- 1.1. Determinar los valores BUA, SOS, I-Stiffness, de los pacientes con ELA en comparación con un grupo control, estratificándolos por sexos.
- 1.2. Comparar los valores estimados de T-score y DMO de los pacientes con ELA en comparación con un grupo control, estratificándolos por sexos.

- 1.3. Analizar posibles diferencias en los parámetros de calidad ósea entre pacientes de ELA con afectación bulbar o espinal.

## **Estudio 2.**

**Objetivo principal:** realizar un estudio descriptivo de posibles alteraciones electrocardiográficas en pacientes con ELA, comparándolo con un grupo control.

### **Objetivos secundarios:**

- 2.1. Analizar las características clínicas de los pacientes de ELA en comparación con el grupo control.
- 2.2. Estudiar los valores métricos de la electrocardiografía de ambos grupos y compararlos.
- 2.3. Analizar la morfología electrocardiográfica a nivel de trastornos de conducción y alteraciones en la repolarización de los pacientes con ELA, teniendo como referencia a personas sanas.
- 2.4. Valorar si existe presencia de ondas Q entre los pacientes con ELA, en comparación con un grupo control.

## **Estudio 3.**

**Objetivo principal:** determinar si la función muscular mejora tras la intervención con EH301.

### **Objetivos secundarios:**

- 3.1. Analizar los resultados clínicos y musculares a los 2 y 4 meses de la intervención del grupo EH301 comparándolo con tiempo 0.
- 3.2. Analizar los resultados clínicos y musculares a los 2 y 4 meses de la intervención del grupo placebo comparándolo con tiempo 0.
- 3.3. Estudio comparativo entre el grupo EH301 y el grupo placebo a los 2 y 4 meses sobre los resultados clínicos y musculares.



3

**Material y métodos.**



### 3 Material y métodos.

---

#### ❖ Diseño del estudio.

La presente tesis consta de 3 estudios: un estudio descriptivo sobre calidad ósea (estudio 1), un estudio descriptivo sobre alteraciones electrocardiográficas (estudio 2), y finalmente un tercer estudio experimental consistente en una intervención con EH301 (estudio 3).

La muestra de pacientes con ELA fue reclutada gracias a la función española para la Investigación de ELA (FUNDELA). A cada paciente se le realizaba una entrevista donde se obtenía toda la información necesaria, y donde se aceptaban o se descartaban los voluntarios para el estudio, mediante los siguientes criterios de selección:

#### · Criterios de inclusión del grupo ELA:

- Pacientes, enfermos de ELA mayores de 18 años, diagnosticados y con sintomatología de la enfermedad de al menos 6 meses.

#### · Criterios de exclusión del grupo ELA:

- Mujeres embarazadas o en estado de lactancia o que no usen un método anticonceptivo eficaz durante el estudio.
- Pacientes con traqueotomía.
- Pacientes con ventilación invasiva o no invasiva con presión ventilatoria positiva.
- Pacientes gastroestomizados.
- Enfermos con evidencia de demencia.
- Enfermos con evidencia de abuso de alcohol o drogas.
- Presencia de infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, disritmia cardíaca, síntomas de angina de pecho u otras complicaciones cardíacas.
- Pacientes infectados de hepatitis B o C, o HIV positivo.
- Pacientes renales con creatinina 2 veces superior a los marcadores normales en última analítica sanguínea (menor a 3 meses).

- Pacientes hepáticos con marcadores hepáticos (ALT, AST) elevados 3 veces por encima de los marcadores normales en última analítica sanguínea (menor a 3 meses).
- Enfermos tratados con anticoagulantes o con problemas hemostáticos.
- Pacientes incluidos en otras investigaciones con medicamentos o terapias en fase de experimentación.
- Pacientes sin un seguro médico.

El estudio se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki<sup>222</sup> después de la aprobación del Protocolo del Comité de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en la Investigación Experimental de la Universitat de València (número de referencia H1479983999044), anexo 1. El registro *Clinical trials* de este ensayo clínico es NCT03489200.

Además, los sujetos a estudio, o en su defecto sus tutores legales firmaron un consentimiento informado (anexo 2).

### ❖ **VARIABLES DETERMINADAS PARA LOS 3 ESTUDIOS.**

#### ➤ **ALSFR-R (Revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale).**

Se trata de uno de los Instrumento más utilizados para medir la progresión del ELA<sup>223</sup>. Consta de 12 ítems agrupados que evalúa la discapacidad del paciente por áreas. Dicha escala ha sido validada al español<sup>224</sup>.

Los cuatro dominios funcionales que evalúa, son: función respiratoria (disnea, ortopnea y apoyo respiratorio), función bulbar (habla, salivación y deglución), función motora fina (escritura, cortar alimentos con utensilios, vestido e higiene) y función motora gruesa (hacer la cama, caminar o subir escaleras) (anexo 3).

➤ **Índice Barthel.**

Éste índice es uno de los más utilizados para la valoración de la función física y discapacidad funcional, además, es utilizado para valorar la actividad funcional, existiendo así, una extensa bibliografía al respecto<sup>225</sup>.

Éste índice, atribuye distintas puntuaciones según las capacidades del paciente para llevar a cabo actividades de la vida diaria (AVD). Consta de un total de 10 ítems sobre las AVD, siendo 8 sobre cuidado personal y 2 sobre movilidad<sup>226</sup>. Su puntuación oscila entre 0 y 100 puntos, cuanto más elevada sea ésta, mayor grado de independencia<sup>227</sup> (anexo 4).

➤ **FEV (volumen espirado forzado).**

Se trata del parámetro de la Espirometría más utilizado para valorar la obstrucción bronquial. Se realiza una inspiración máxima hasta la capacidad pulmonar total para ser exhalado forzosamente más tarde hasta llegar al volumen residual.

Pacientes con ELA puede no obtenerse FEV, por la pérdida de la fuerza en los músculos espiratorios. Al no tener la suficiente fuerza para mantener un flujo espiratorio durante un prolongado tiempo<sup>228</sup>.

➤ **MRC (Medical Research Council).**

La escala MRC es ampliamente aceptada y se utiliza con frecuencia. Medida directa basada en la fuerza muscular que se utiliza también en pacientes con ELA<sup>229</sup>.

Dicha escala, se ha utilizado en cada paciente para 8 músculos diferentes: bíceps derecho e izquierdo, tríceps, cuádriceps y tibial. Para calcular el índice de la escala MRC total, se ha asignado a cada paso y a cada músculo un número que aumentaba progresivamente de 0 (0 en la escala MRC) a 10 (5 en la escala MRC). El índice de MRC total por paciente corresponde a la suma de los números dados a los ocho músculos<sup>230</sup> (anexo 5).

## ➤ Antropometría.

La medición de la antropometría se realizó de acuerdo con las recomendaciones de los Estándares Internacionales para la Evaluación Antropométrica (ISAK; International Society for the Advancement of Kinanthropometry)<sup>231</sup>, para: altura, peso y pliegues.

Cada medición se repitió 3 veces, calculando posteriormente su valor promedio. El equipo de medición (figura 23) se calibró regularmente para uso clínico.



Figura 23. Plicómetro, Pie de Rey, Cinta métrica. Fuente: Tesis Vicente Lizondo.

El índice de masa corporal (IMC) se calculó como el peso (kg) dividido por el cuadrado de la altura en metros ( $m^2$ ). La masa corporal grasa fue estimada de acuerdo con la ecuación de Faulkner<sup>232</sup>, tras haber medido siete pliegues cutáneos (tríceps, bíceps, subescapular, abdominal, suprailíaco, muslo y pantorrilla medial) figura 24; perímetros de brazos, muslos y pantorrillas (figura 25); el diámetro biestiloideo y ambos diámetros intercondíleos en el húmero distal y el fémur (figura 26).

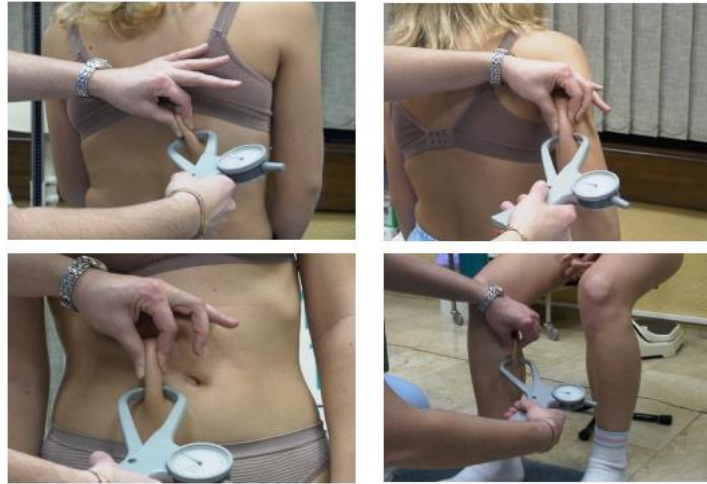


Figura 24. Grosor de los pliegues cutáneos. Fuente: Tesis Vicente Lizondo.



Figura 25. Perímetros de brazo, muslo y pierna (cm). Fuente: Tesis Vicente Lizondo.



Figura 26. Diámetros biestiloideo e intercondíleo de humero y fémur distal (mm). Fuente: Tesis Vicente Lizondo.

Todas las técnicas fueron realizadas por el mismo operador, con el fin de evitar posibles sesgos en la realización de las mismas.

### 3.1 **Estudio 1. Valoración de la calidad ósea. Densitómetro de calcáneo.**

#### ❖ **Diseño del estudio.**

Estudio descriptivo transversal de la calidad ósea que fueron incluidos para un ensayo clínico en un solo centro, aleatorizado, doble ciego valorando la calidad ósea mediante estudio ultrasonográfico de calcáneo. La muestra se estratificó en dos subgrupos; grupo medular y grupo bulbar. Esta información fue obtenida de la historia clínica del paciente. Además también se obtuvo un grupo control aleatorizado, sin enfermedades neurodegenerativas para la comparación de los resultados. Todos los participantes firmaron su consentimiento por escrito. Los electrocardiogramas fueron realizados durante el inicio del periodo del estudio 3.

#### ❖ **Participantes.**

En el estudio se incluyó una muestra total de 33 pacientes con ELA de ambos sexos. La muestra fue estratificada por tipo de ELA, bulbar/medular. Los participantes tenían entre 37 y 79 años con una media de  $55,73 \pm 10,3$  años.

Además de los criterios de exclusión descritos anteriormente, para este primer estudio se aplicaron los siguientes específicos:

- Estar en tratamiento con antirresortivos o bifosfonatos.
- Sujetos con ingesta de fármacos que pudieran interferir en el metabolismo óseo.

En cuanto a la selección de los participantes sanos, empleados para el grupo control, fueron los siguientes:

#### · Criterios de inclusión del grupo control:

- Pacientes voluntarios con edades comprendidas entre 37 y 79 años.

#### · Criterios de exclusión del grupo control:

- Pacientes con enfermedades neuromusculares.

- Pacientes en tratamiento con antirresortivos.
- Pacientes con ventilación invasiva o no invasiva con presión ventilatoria positiva.
- Enfermos con evidencia de demencia y/o Parkinson.
- Enfermos con evidencia de abuso de alcohol o drogas.
- Pacientes infectados de hepatitis B o C o HIV positivo.
- Pacientes con cirugías en calcáneo (prótesis, implantes...).
- Pacientes con heridas en el pie.

Un grupo de 66 sujetos sanos de la misma edad y similares características sirvieron para conformar un grupo control. La relación ELA / controles sanos fue de 1:2 manteniendo una proporción similar de hombres y mujeres en el grupo control que la incidencia de la enfermedad por sexo observada en el grupo ELA. Del mismo modo, todos los participantes firmaron un consentimiento una vez explicado los objetivos y procedimientos del estudio.

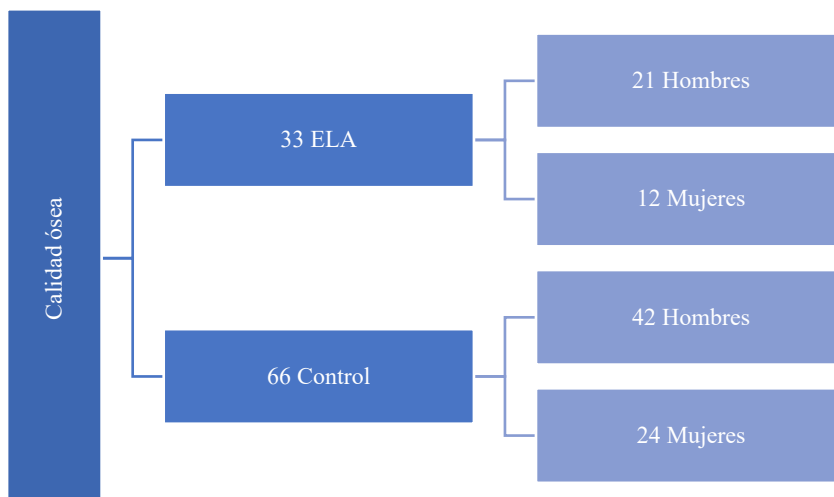


Figura 27. Población incluida en el estudio de calidad ósea.

## ❖ Tamaño muestral

El tamaño de la muestra se ha estimado para detectar una diferencia entre dos medias usando DMO como la variable más pertinente y considerando una diferencia superior a 0,100 g/cm<sup>2</sup> como clínicamente relevante. Para tener una potencia del 80%, y suponiendo una desviación típica de 0,110 g/cm<sup>2</sup> y un nivel de significación bilateral de 0,05, el tamaño de muestra mínimo requerido fue de 15 sujetos en el grupo de ELA y de 30 en el

grupo control. Se ha establecido un factor de equilibrio entre grupos de 2 al considerar mucho más limitado el grupo de personas ELA con respecto al control.

La fórmula y datos utilizados se muestran a continuación en la figura 28.

		Contraste de hipótesis	Fórmulas empleadas
Significación ( $\alpha$ ):	5,00%	H <sub>0</sub> : $\mu_1 = \mu_2$ H <sub>1</sub> : $\mu_1 \neq \mu_2$	$n_1 = \frac{(k + 1)(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{k(\mu_1 - \mu_2)^2}$
Desviación típica esperada ( $\sigma$ ):	0,11		
Sensibilidad ( $e$ ):	0,1	<b>Muestras requeridas</b>	$n_2 = kn_1$
Factor de equilibrio ( $k$ ):	2		
Fracción esperada de pérdidas ( $R$ ):	0%		
Potencia deseada ( $1 - \beta$ ):	80,00%	$n_1$	30
		$n_2$	60
Semiámplitud prevista del IC ( $d$ ):	0,100	$n_1 + n_2$	90

Figura 28. Fórmula para calcular tamaño muestral. <https://www.imim.es/ofertadeserveis/software-public/granmo/>

## ❖ Metodología para la determinación de la calidad ósea.

### Medidas antropométricas, clínicas y metabólicas.

El peso y la estatura de cada participante se midieron y registraron utilizando los mismos equipos, calibrados previamente. El índice de masa corporal (IMC) se calculó con el peso (kg) dividido por el cuadrado de la altura en metros (m<sup>2</sup>). En pacientes con ELA, porcentaje de masa grasa y muscular se obtuvieron según procedimientos estándar<sup>233</sup>.

Las principales medidas clínicas basales incluyeron la puntuación ALSFRS-R<sup>234</sup>, índice de Barthel para las actividades de la vida diaria, función pulmonar medida mediante la capacidad vital forzada (FVC) y MRC modificada de 11 pasos<sup>235</sup>.

Las pruebas de laboratorio incluyeron suero calcio, 25-OH-colecalciferol (vitamina D), ALP, T4 y TSH.

### Evaluación de la calidad ósea.

A todos los sujetos participantes en el estudio se les evaluó la masa ósea mediante la técnica QUS. Todas las mediciones de la masa ósea fueron realizadas por el mismo técnico y mediante el mismo densitómetro de ultrasonidos.

Para la obtención de las mediciones, fueron necesarios los siguientes elementos:

- Consulta habilitada en la misma clínica donde se realizó el estudio con conexiones de luz.
- Silla sin reposabrazos. Para poder realizar la densitometría de calcáneo siguiendo las especificaciones del fabricante.
- Ordenador (1) con el software del densitómetro instalado.
- Densitómetro.
- Ordenador (2) con hoja Excel para recogida de datos.
- Agua destilada para mantenimiento del densitómetro.
- Alcohol 70°, para cada toma. Siguiendo especificaciones del fabricante.

Para la valoración ósea se ha utilizado un densitómetro por ultrasonidos de calcáneo, marca General Electric®, modelo Achilles Insight (figura 29). Con el cual se tomaron 2 mediciones en calcáneo de pie dominante, para más tarde obtener una media.



Figura 29. Densitómetro de calcáneo Achilles Insight, GE. Utilizado en el estudio.

Tal y como ya se descrito en la introducción, este método está claramente estudiado en diferentes artículos para el cribado de una densitometría DEXA que utiliza radiación y descartar diagnóstico de osteoporosis<sup>127-133</sup>.

En la medición por ultrasonidos del calcáneo se obtienen diferentes parámetros distintos al método DEXA, como, BUA, SOS e Índice Stifness (figura 30). Y la obtención de datos se hizo por duplicado en cada pie siendo recogido en una hoja de cálculo, para más tarde extraer una media.

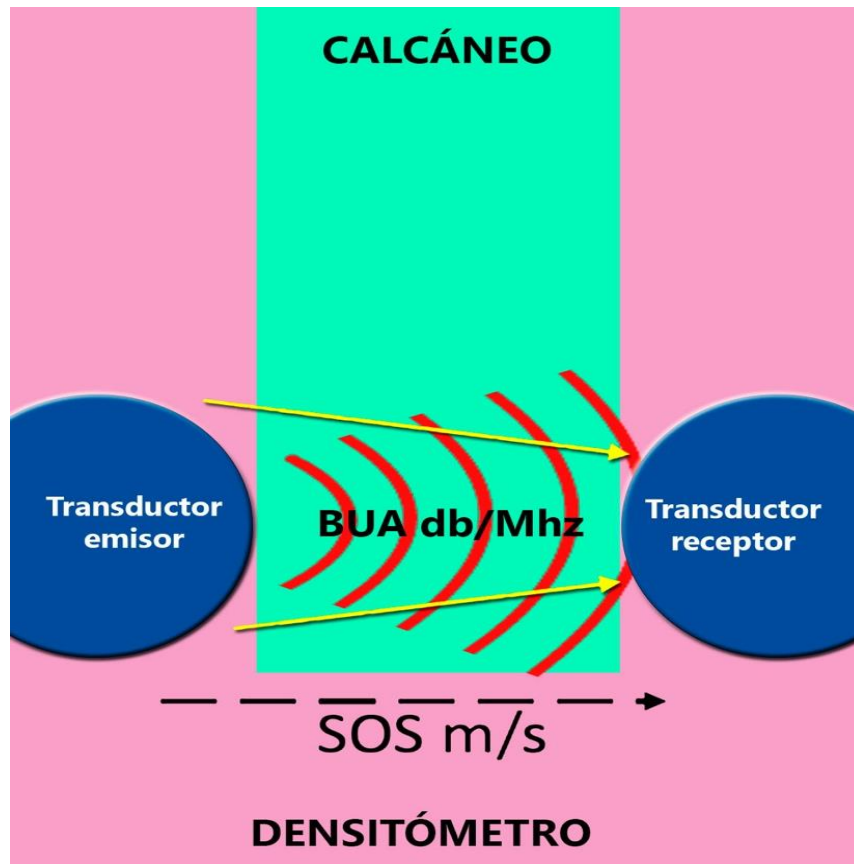


Figura 30. Mediciones que realiza Achilles Insight GE. Elaboración propia.

Se siguieron en todo momento las indicaciones del fabricante del densitómetro para la obtención de las mediciones, describiéndose a continuación:

1º Puntos a tener en cuenta.

Se evitaron:

- Talones con heridas abiertas.
- Talones con lesiones previas en pierna, pie o mismo talón, ya que pueden influir en la actividad musculoesquelética y, por tanto, en los resultados.
- Se ha valorado el grosor y la dureza del talón, para aplicar más o menos cantidad de alcohol 70% para su medición.

2º Introducción de la información del sujeto.

Los datos del paciente se introducían en el programa del densitómetro en un ordenador portátil, desde donde se manejaba el densitómetro mediante un software propio. En él se creaba una base de datos de todos los pacientes, creando fichas personales con diferentes medidas: número identificación, nombre y apellidos, edad, sexo, altura, peso, pie que se medía (derecho o izquierdo), edad menopausia (si procedía) y etnia (figura 31).

Figura 31. Hoja de recogida de datos de afiliación (software).

### 3º POSICIONAMIENTO DEL PACIENTE.

Al paciente se le sentaba en una silla estable sin ruedas, en una posición recta y cómoda. El pie, la pantorrilla y el muslo debían de estar alineados en el centro del densitómetro (figura 32, A), ajustando el densitómetro al paciente y no al revés. La pantorrilla debía descansar sobre su soporte y el talón en su posición, apoyando su parte más posterior sobre el soporte (figura 32, B).

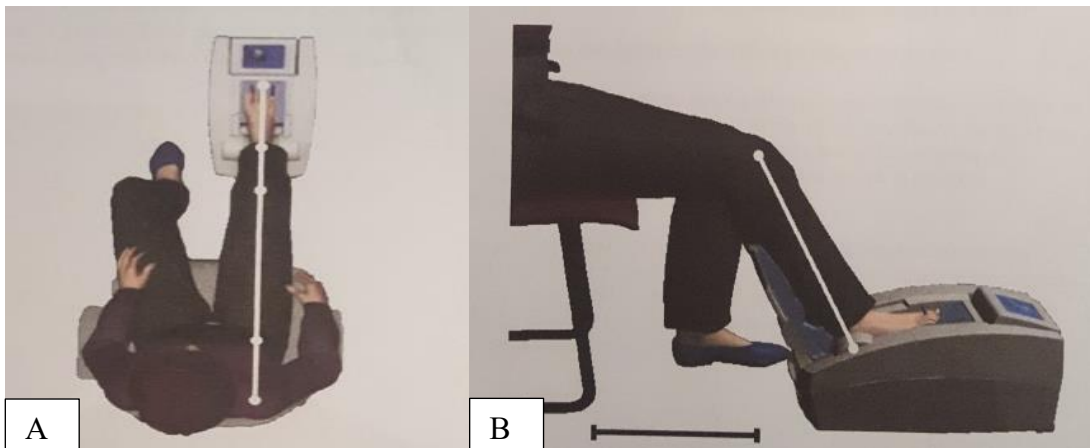


Figura 32. Posición del paciente. Elaboración propia.

#### 4º Medición.

Antes de cada jornada, se realizaba una calibración, además, se limpió la unidad en cada paciente. Una vez realizado esto, se procedía a la introducción de datos.

1º. Se crea el documento con el ID del paciente y sus datos personales.

2º. Se aplicaba mediante pulverizador una capa de alcohol al 70% en ambos lados del calcáneo (figura 33) para la correcta lectura ecográfica.

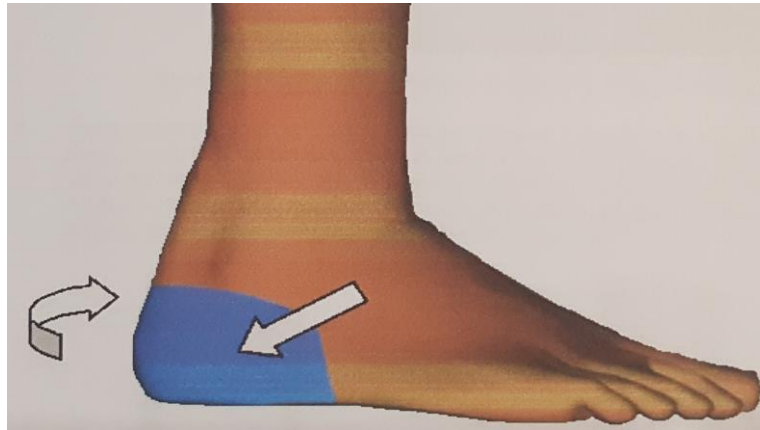


Figura 33. Zonas de aplicación del alcohol 70º. Elaboración propia.

3º. Se aplica alcohol al 70% en ambas membranas (figura 34).

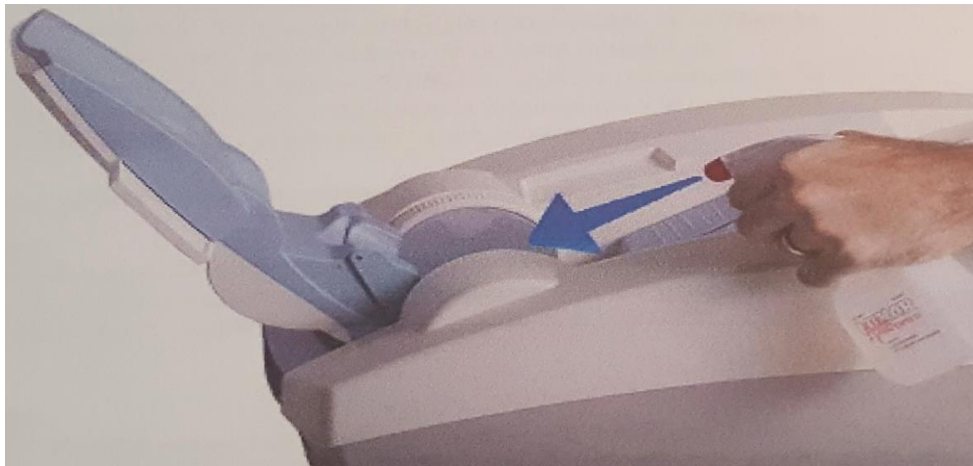


Figura 34. Aplicación del alcohol en las membranas del densitómetro. Elaboración propia.

4º. Se colocaba el talón entre ambas membranas (figura 35), asegurándose de que el pie estuviese plano y colocado firmemente en su posición con el talón apoyado sobre su soporte.

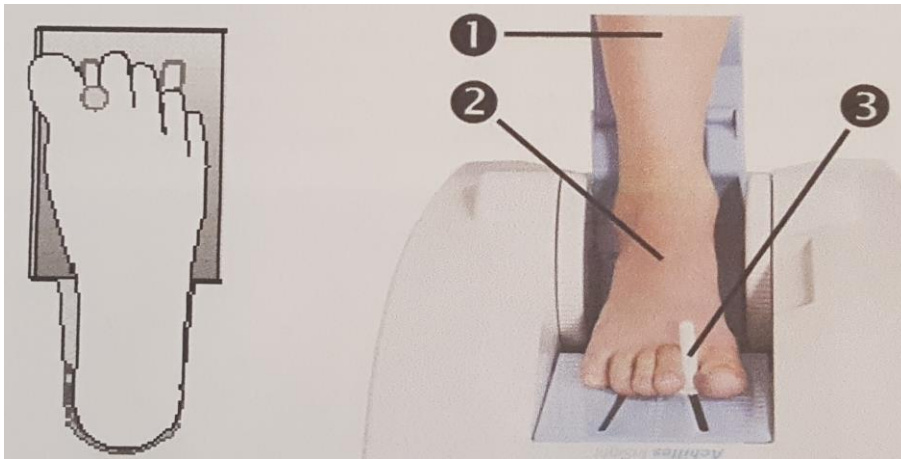


Figura 35. Ajuste posicionar dedos. Elaboración propia.

5°. Una vez colocado el paciente, se iniciaba la medición del calcáneo. Esta medición se realizó por duplicado. En este apartado el sujeto debe mantenerse inmóvil. Llegados a este punto, se hinchan ambas membranas laterales con agua destilada para favorecer el paso de los ultrasonidos. Dicho proceso tarda menos de un minuto.

6°. Hoja de recogida de resultados. Una vez finaliza la medición, en el PC donde está instalado el software, aparece un PDF con toda la información de la medición (figura 36) con datos del paciente y medidas obtenidas. Estas mediciones se escriben en hoja de cálculo Excel (PC2) en el mismo momento para manejo de datos más cómodo y fácil.

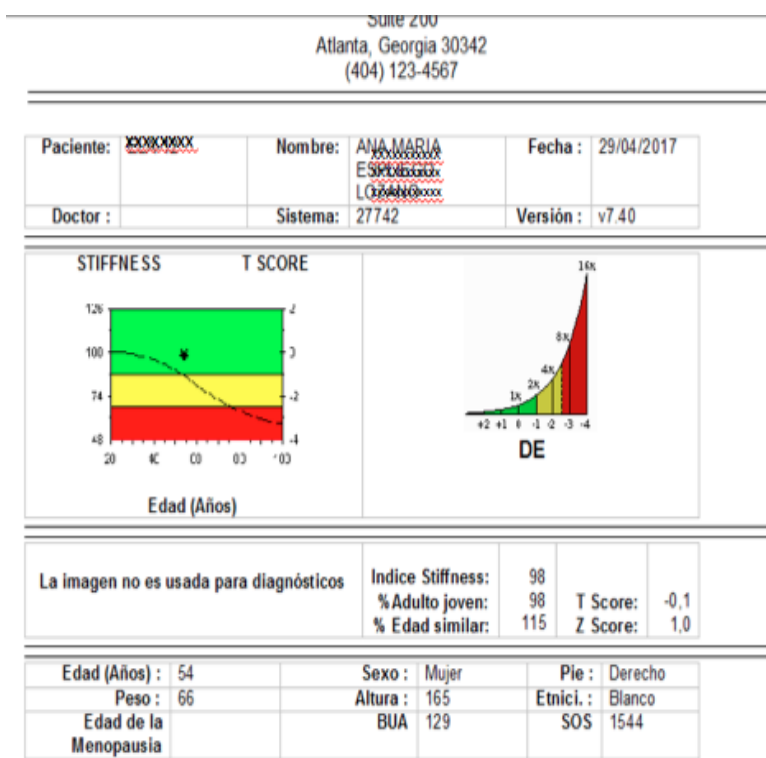


Figura 36. PDF resultado medición sujeto. Fuente: software.

7°. Parámetros de calidad ósea. La técnica de atenuación de ultrasonidos se realizó debido a sus ventajas: el tiempo empleado para la medición es corto (1-2 min), no utiliza radiación ionizante, es portátil, alta tasa de reproducibilidad, ausencia de efectos adversos, etc. El dispositivo Lunar Achilles Insight® permite la estimación de 2 parámetros básicos: atenuación de ultrasonido de banda ancha (BUA) y velocidad del sonido (SOS).

La BUA (dB/MHz) se refiere a la absorción de energía por parte de los huesos y tejidos blandos, al ser estos atravesados por ultrasonidos. Un aumento de BUA se traduce en una trabécula ósea extensa.

Por otro lado, el SOS (m/s) mide lo que tardan en traspasar las ondas de sonido las trabéculas óseas. Un SOS aumentado se correlaciona con un bajo contenido óseo<sup>236</sup>.

Ambas mediciones ecográficas constituyen una variable clínica denominada índice de rigidez (I-Stiffness) que se expresa como porcentaje del valor medio en un adulto joven, además, se utiliza para determinar el riesgo de fracturas osteoporóticas y es comparable a la DMO que se mide por DXA<sup>237,238</sup>.

En nuestro laboratorio, la variabilidad intraoperatoria para BUA y SOS fue de 13.7% y 3.2%, respectivamente. De conformidad con los criterios de la OMS para BUA, las puntuaciones T iguales o inferiores a -1,5 se consideraron una indicación de osteoporosis<sup>239</sup>. La densidad mineral ósea (DMO) estimada del talón se calculó utilizando la ecuación  $33 \times (BUA + SOS) - 3.687$ <sup>240</sup>.

### ❖ **Análisis estadístico.**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software SPSS versión 21 (IBM Corporation, Chicago, IL, EE. UU.). Los valores cuantitativos se expresaron como medias, desviaciones estándar (DE) e intervalos de confianza del 95%. La distribución de las variables se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre los grupos se realizaron al inicio del estudio utilizando las pruebas t de Student. Se utilizó un ANOVA de una vía (grupo sano / personas sedentarias con DI / jugadores de fútbol con ID) para probar las posibles diferencias entre grupos. Se realizó un subanálisis del grupo de participantes con DI para comparar individuos con SD y sin SD. Debido al pequeño tamaño de la muestra, se utilizó la prueba no paramétrica Kurskal-Wallis para este subanálisis. Los coeficientes de correlación de Pearson se calcularon para evaluar el vínculo potencial entre los parámetros de calidad ósea y las variables antropométricas. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### 3.2 **Estudio 2. Valoración de la actividad cardíaca.** **Electrocardiograma.**

#### ❖ **Diseño del estudio.**

Estudio observacional transversal electrocardiográfico en pacientes con ELA. Por otro lado, se realizaron electrocardiografías a un grupo control libres de enfermedades neurodegenerativas. Los electrocardiogramas fueron realizados durante el periodo del estudio 3.

#### ❖ **Participantes.**

En el presente estudio se incluyó una muestra total de 30 pacientes con ELA de ambos sexos. Los participantes tenían entre 37 y 79 años con una media de  $59,71 \pm 10,9$  años.

Además de los criterios de exclusión generales descritos anteriormente, para este segundo estudio se aplicaron los siguientes criterios específicos:

- Estar en tratamiento cardiológico.
- Trasplante corazón.

En cuanto a la selección de los participantes sanos, empleados para el grupo control, fueron los siguientes:

#### · Criterios de inclusión del grupo control:

- Pacientes voluntarios con edades comprendidas entre 40 y 72 años.

#### · Criterios de exclusión del grupo control:

- Pacientes con enfermedades neuromusculares.
- Pacientes con ventilación invasiva o no invasiva con presión ventilatoria positiva.
- Enfermos con evidencia de demencia y/o Parkinson.
- Enfermos con evidencia de abuso de alcohol o drogas.

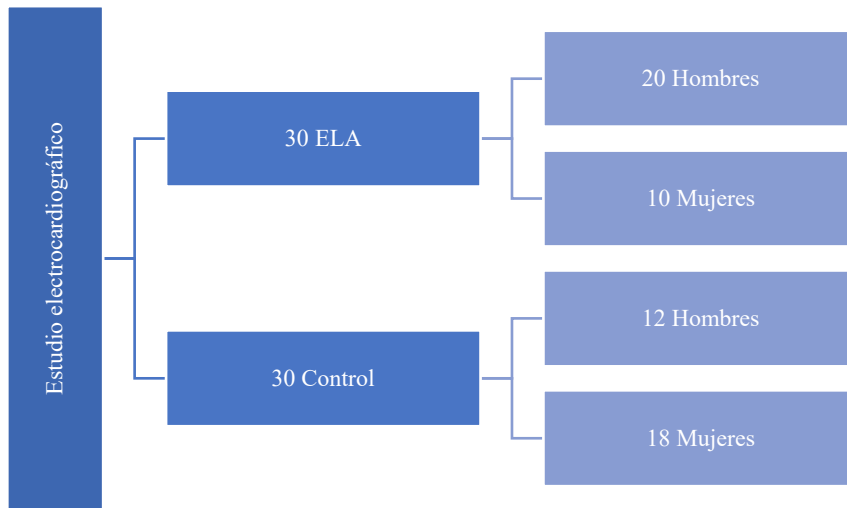


Figura 37. Población incluida en el estudio electrocardiográfico.

Un grupo de 30 sujetos sanos y voluntarios de la misma edad y sin patología cardíaca sirvieron para conformar un grupo control, estando formado por 12 hombres y 18 mujeres.

### ❖ Tamaño muestral.

Para evaluar si los enfermos con ELA tienen una proporción significativamente mayor de anomalías en el ECG utilizamos un modelo para cálculo del tamaño muestral para comparación de dos proporciones. Sabemos por datos previos que la prevalencia de trastornos inespecíficos de la repolarización es del 16% en población sana por encima de 40 años<sup>241</sup> y consideramos clínicamente relevante si en los pacientes con ELA esta proporción llega al 45%. Nuestro nivel de riesgo lo fijamos en 0.05 y deseamos un poder estadístico de un 80%. La formula resultante seguirá estos criterios:

$$n = \frac{\left[ Z_{\alpha} * \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta} * \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)}$$

**Z $\alpha$** : riesgo alfa fijado, probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera **p**: valor de la población que se supone existe en la población. **Z $\beta$** : riesgo beta fijado, probabilidad de no detectar un hallazgo como importante y atribuirlo al azar. **p<sub>1</sub>**: población 1. **p<sub>2</sub>**: población 2.

Aplicando dicha formula, el nº de sujetos en cada grupo (ELA y Control) será de 30 pacientes. Si estimamos un índice de pérdidas del 15%, el nº de pacientes en cada grupo podría llegar a 35.

## ❖ Metodología para la realización de los electrocardiogramas.

-Grupo ELA: Se han realizado 3 mediciones manuales, mediante lupa calibrada en décimas de mm, en 3 complejos sucesivos, de cada una de las variables, obteniéndose la media de ellas.

-Grupo Control: Se toman los resultados obtenidos de forma automática por el propio electrocardiógrafo (Mac 1200 ST®), de cada una de las variables, excepto para la lectura de las variables morfológicas, que son interpretadas por un cardiólogo con experiencia en pacientes neurodegenerativos.

Para la valoración de la actividad cardíaca se ha utilizado un electrocardiograma de la marca GE Medical Systems, modelo MAC 1200, versión 6 del software, (figura 38).



Figura 38. Electrocardiógrafo MAC 1200 GE. Utilizado en el estudio.

Antes de llevar a cabo cualquier técnica, se preparó todo el material necesario, como:

- Calibración del electrocardiógrafo. Es un proceso que realizan de forma automática en todos los electrocardiógrafos modernos y que asegura la fiabilidad de los resultados. No obstante, debe comprobarse la señal de calibración y velocidad del papel para evitar errores de observación. La calibración estándar (N) es la de  $1 \text{ mV} = 10 \text{ mm}$ . La velocidad estándar es la de  $25 \text{ mm/s}$ .
- Electrodo de miembros y precordiales. Todos ellos adecuadamente limpios y desengrasados, debiendo eliminar todos los restos de oxidación y de los geles

utilizados que pudieran haber cristalizado para asegurar una correcta transmisión del registro.

- Identificación y colocación de cada uno de los cables de las derivaciones precordiales (el extremo de cada cable está rotulado con las siglas y el código de color de identificación).
- Papel termosensible milimetrado.
- Camilla con patas de madera evitar las interferencias de corriente alterna alejando la camilla de medición de fuentes eléctricas contaminantes.

### **Técnica electrocardiográfica (ECG).**

Se explicaba al paciente que debía dejar desnudo el tórax y desabrochar pantalón, dejando en sedestación durante 3 min durante los cuales se les medían la presión arterial, asegurándonos que se encontraba dentro de los márgenes de normalidad, antes de continuar con el procedimiento. A continuación, se le indicaba qué posición debía adoptar en la cama, con una elevación de 30° la parte caudal, además de retirar los objetos metálicos, limpieza con una gasa impregnada en alcohol la zona interior de las muñecas, de los tobillos y la zona de colocación de los electrodos (con ello se disminuye la grasa de la piel y se facilita la conducción eléctrica).

Seguidamente se procedió a la colocación de los electrodos (pinzas) periféricos en muñecas y tobillos, colocándolos siempre en superficies carnosas, evitando las prominencias óseas y las superficies articulares, conectando cada uno de los cables a su electrodo periférico correspondiente (el extremo de cada cable está rotulado con las siglas y el código de color de identificación).

Para finalizar la técnica, se colocaron los electrodos precordiales;

- V1. Cuarto espacio intercostal derecho, junto al esternón.
- V2. Cuarto espacio intercostal izquierdo, junto al esternón.
- V3. En un lugar equidistante entre V2 y V4 (a mitad del camino de la línea que une ambas derivaciones).
- V4. Quinto espacio intercostal izquierdo, en la línea medio clavicular.
- V5. Quinto espacio intercostal izquierdo, en la línea axilar anterior.
- V6. Quinto espacio intercostal izquierdo, en la línea axilar media.

Una vez todo preparado, se pedía al paciente que no hablara y que respirase con la máxima tranquilidad posible.

### Parámetros electrocardiográficos.

- **Variables epidemiológicas:** edad y sexo.
- **Variables métricas del ECG:** Frecuencia cardíaca (FC), RR, PP, P máxima, P mínima, dispersión de P, QRS, QT, QTc Bazzet, ST, Eje P, Eje QRS, Eje T, R V 5-6, S V 1, R aVL y S V 3.
- **Variables morfológicas del ECG:** bloqueos auriculo-ventriculares, trastornos de conducción, alteraciones en la repolarización, presencia de ondas Q y otros hallazgos.

- **Cálculo del segmento PR:** Se mide desde el comienzo de la onda P hasta el comienzo de la onda Q ó R. Esta distancia debe ser de 0,12-0,20s, o lo que es lo mismo 120-200ms. Cuando el segmento PR es < 0.12 s se dice que existe una conducción auriculoventricular acelerada. Lo que se da en los síndromes de pre-excitación. Cuando el intervalo PR > 0.20s se dice que la conducción auriculoventricular esta enlentecida y hay un bloqueo de primer grado. La prolongación del intervalo PR (> 0,20 s.)<sup>156</sup>.

- **Cálculo intervalo QT:** Representa la despolarización y la repolarización ventricular. Este se mide desde el comienzo del complejo QRS hasta el final de la onda T y su medida depende de la frecuencia cardíaca, así el intervalo QT se acorta cuando la frecuencia cardíaca es alta y se alarga cuando es baja. Por eso cuando este se mide, debe corregirse de acuerdo con la frecuencia cardíaca.

El intervalo QT corregido es el intervalo que una persona sana tendría teóricamente a una frecuencia de 60 latidos por minuto<sup>242</sup>. La fórmula utilizada para dicha corrección es la de Bazzet (1920), que resulta del procedimiento de medir el intervalo QT, dividiéndolo sobre la raíz cuadrada de la distancia hallada entre R y R (frecuencia cardíaca):

$$QTc = QT / \sqrt{RR}$$

- **Cálculo del eje eléctrico del QRS en plano frontal:** El vector medio QRS puede estimarse a partir de las derivaciones estándar y monopolares de los miembros aplicando el sistema hexaxial de Bailey. Se mide la amplitud neta y la dirección del complejo QRS en dos de las 3 derivaciones estándar. Las derivaciones D1 y D3 y los valores obtenidos

se transportan a dicho sistema. Se trazan líneas perpendiculares a las dos derivaciones estándar elegidas y se calcula el vector resultante que representa el vector medio del QRS.

Otro modo de calcular el eje del QRS es localizando la derivación isodifásica, aquella cuya amplitud neta es igual a cero. Entonces el vector medio QRS se encontrará en la perpendicular a la derivación donde el complejo es isodifásico. Así el complejo QRS es isodifásico en aVF, la perpendicular a esta derivación es D1 y si en esta derivación el valor neto del QRS es negativo en D1, el eje de QRS estará a  $180^{\circ}$ <sup>243</sup>.

Tabla VI. Resumen de valores normales de un electrocardiograma.

	P (ms)	P (mV)	P°	QRS (ms)	QRS (mV)	QRS°	QTc (ms)	T (mV)	T°
<i>Mínimo</i>	90	0,1	40	60	1	0	350	0,2	40
<i>Máximo</i>	120	0,25	60	120	3	90	450	0,3	60

P, QRS y T: Ondas del ECG. QTc: QT corregido. ms: milisegundos. mV: milivoltios. °: Eje eléctrico en grados.

### **- Trastornos de conducción:**

Desviación del eje a la izquierda existirá cuando el eje de QRS esté por debajo del límite inferior de la normalidad para la edad. Se presenta con:

- a) Hemibloqueo anterior izquierdo.
- b) Bloqueo de Rama Izquierda.
- c) Hipertrofia Ventricular Izquierda (especialmente en sobrecarga de volumen).

Desviación del eje a la derecha existirá cuando el eje de QRS es mayor que el límite superior de la normalidad para esa edad. Se presenta con:

- a) Hipertrofia ventricular derecha (HVD).
- b) Bloqueo de rama derecha (BRD).

– Alteraciones en la repolarización:

Morfología de las ondas electrocardiográficas y longitud de ciertos segmentos como el QT.

**- Voltaje y calibración del tiempo del electrocardiograma.** Todos los trazados del electrocardiograma se obtienen sobre papel de registro adecuadamente calibrado. Las líneas de calibración verticales están dispuestas de tal modo que 10 divisiones pequeñas hacia arriba o hacia abajo corresponden con un milivoltio, siendo los potenciales positivos por encima de la línea base y los potenciales negativos por debajo de la misma. Las líneas horizontales del electrocardiograma son líneas de calibración del tiempo. Cinco

cuadrados grandes corresponden a un segundo, cada cuadrado grande está dividido por 5 cuadrados más pequeños, equivaliendo a 0,04s (40 ms)<sup>156</sup>.

### ❖ **Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos han sido introducidos en una base de datos realizada con el programa Excel de Microsoft®. Las variables estudiadas se importaron al paquete fStats®, con el que se ha realizado el análisis estadístico de los datos (descriptivo, diferencia de medias independientes o pareadas). Se aceptó una significación estadística con valor de  $p < 0.05$ .

### **3.3 Estudio 3: Valoración electromiográfica de una intervención con EH301.**

#### **❖ Diseño del estudio.**

Se trata de un estudio prospectivo, longitudinal, mixto, analítico y experimental a través de un ensayo clínico de pacientes con ELA.

Este estudio se realizó en un solo centro siendo aleatorizado, doble ciego, controlado con grupo placebo. Este estudio fue registrado en ClinicalTrials.gov (NCT03489200).

Tras la aleatorización de los pacientes con ELA seleccionados, se realizó la intervención que consistió en tratamientos diarios, en función del grupo, con una base de dieta mediterránea.

-Grupo 1 EH301 (intervención): se administró 1.200mg (4 cápsulas) de una combinación de pterostilbeno (50mg/cápsula) y nicotinamida ribósido (250mg/cápsula), denominada EH301, proporcionado por Elysium Health, Inc., NY (USA), repartidos en dos tomas (desayuno 2 cápsulas y cena 2 cápsulas).

-Grupo 2 (grupo control): se les administró un placebo compuesto por píldoras de celulosa microcristalina, del mismo tamaño, color y forma que EH301, repartidos en dos tomas (almuerzo y merienda).

La dieta mediterránea base que recibieron todos los participantes con ELA, se diseñó de modo individual y según las necesidades energéticas de cada paciente. Consistió en una dieta isocalórica, baja en carbohidratos, con un reparto calórico aproximado de un 20% de proteínas, un 40% de carbohidratos y un 40% de grasa (aprox. 2.300 kcal/d en total). Se pueden ver ejemplos de dieta en el anexo 6.

Basándonos en estudios previos<sup>1,23</sup> y realizando una correlación se determinó que el estudio debía tener una duración de cuatro meses, para asegurarnos poder visualizar resultados.

Antes de iniciar la administración de los nutrientes se realizaron las primeras valoraciones (descritas a continuación). Estas se repetían cada dos meses y al final de la intervención (a los 4 meses), siempre a las 10:00 AM.

También se analizaron diferentes parámetros antropométricos, además de realizarles electromiografías y escala de valoración ALSFRS-R y FVC (capacidad vital forzada).

La aleatorización se estratificó por edad, duración de síntomas y puntuación ALSFRS-R basal. El estudio fue doble ciego, incluidos los pacientes y el personal sanitario participante, salvo los investigadores principales.

Este ensayo exploratorio ha sido objeto de un simulacro de auditoría de monitorización biométrico por la FDA por PAREXEL International, Inc. utilizando los estándares internacionales para ensayos clínicos en humanos. En esta auditoría, PAREXEL concluyó que este estudio se realizó de modo ético, moralmente de forma controlada, y los resultados dan crédito a la eficacia y seguridad de EH301 en el tratamiento de ELA.

### ❖ **Participantes.**

En el estudio se incluyó una muestra total de 32 pacientes con ELA de ambos sexos. Los participantes tenían entre 37 y 79 años con una media de  $55,73 \pm 10,3$  años.

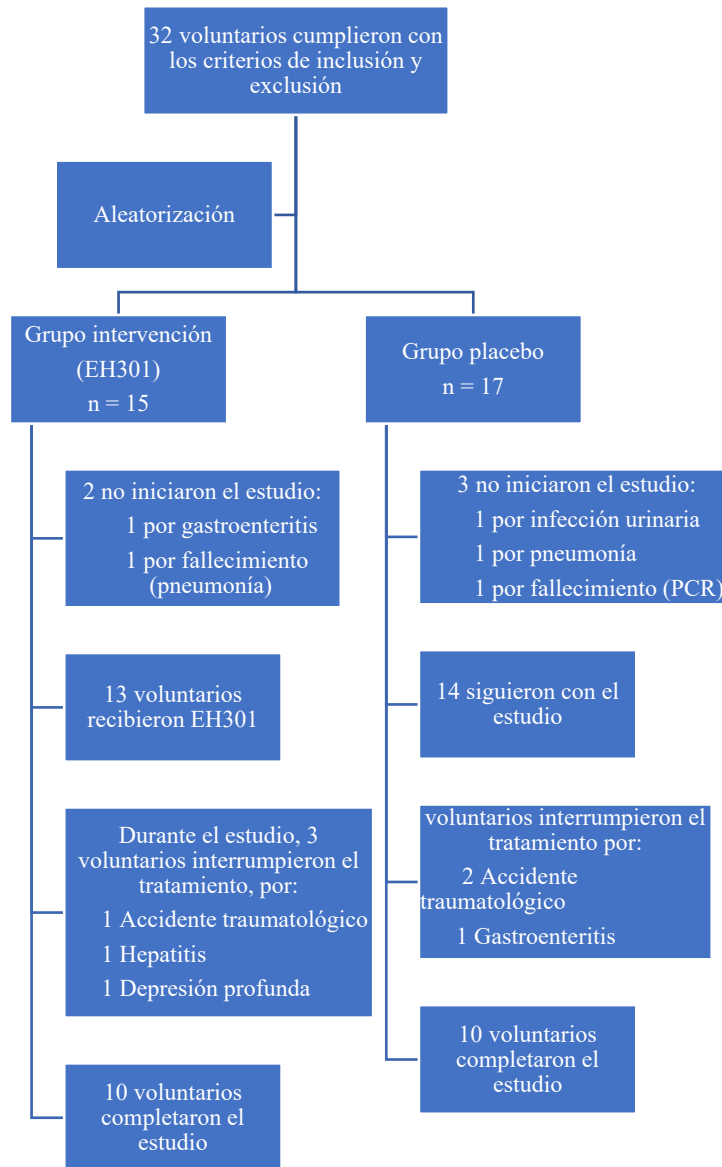


Figura 39. Diagrama de flujo. Población incluida en el estudio de intervención.

En todas las pruebas de este estudio se procedió de igual manera, informando a los participantes sobre los objetivos y los procedimientos que iban a ser utilizados en el estudio. El consentimiento informado por escrito fue obtenido de todos los voluntarios para el estudio, dando todos los participantes su consentimiento para participar en él (anexo 2). Fue aprobado por el comité de ética en investigación de la Universitat de València (H1479983999044), ver anexo 1. Todo el estudio se adhirió a la Declaración de Helsinki para la investigación con sujetos humanos.

## ❖ **Tamaño muestral**

Se calculó que, para detectar una diferencia de 7 puntos, con desviaciones estándar hipotéticas dentro de grupos de 8, un nivel de confianza del 95% y una potencia del 80%, serían necesarios 44 pacientes (22 en cada grupo). Sin embargo, al tratarse de una enfermedad con baja prevalencia, se espera que el número de pacientes con ELA en la Comunidad Valenciana sea bajo, lo que implicaría una corrección por población finita en la estimación del tamaño muestral necesario.

Como ya se ha mencionado anteriormente (apartado de Epidemiología de ELA), la prevalencia de esta oscila entre los 2 y 5 casos por cada 100.000 habitantes en España. Concretamente en territorios limítrofes a la Comunidad Valenciana como es Cataluña, esta prevalencia se ha estimado en 5,4 por cada 100.000. Por todo ello, parece razonable suponer una prevalencia de alrededor de 5 por cada 100.000 habitantes en nuestra región.

En base a esto, y teniendo en cuenta que la Comunidad Valenciana tiene una población de 2.548.000 personas, se estima que habrá aproximadamente 127 personas con ELA. Como se trata de una población pequeña (finita), realizamos la corrección del tamaño de la muestra de la siguiente manera:

$$n_e = \frac{n}{1 + \frac{n}{N}} = \frac{44}{1 + \frac{44}{127}} = 32.678$$

## ❖ **Metodología para la determinación de electromiografía.**

La EMG no es más que el registro en papel de la actividad muscular. Ésta puede ser monitoreada a través de electrodos insertados dentro de los músculos (electrodos intramusculares) o a través de electrodos en la superficie de la piel sobre el músculo (electrodos superficiales).

La monitorización muscular es muy compleja debido a la captación de la señal minúscula producida por el músculo.

Los músculos suelen generar tensiones de  $\pm 100$  mV durante la contracción, pero al llegar a la superficie, son atenuadas por tejido interno y la piel, llegando la señal muy debilitada a la superficie de esta. Músculos grandes como bíceps emiten 2,1 mV a la superficie en amplitud de señal<sup>244</sup>.

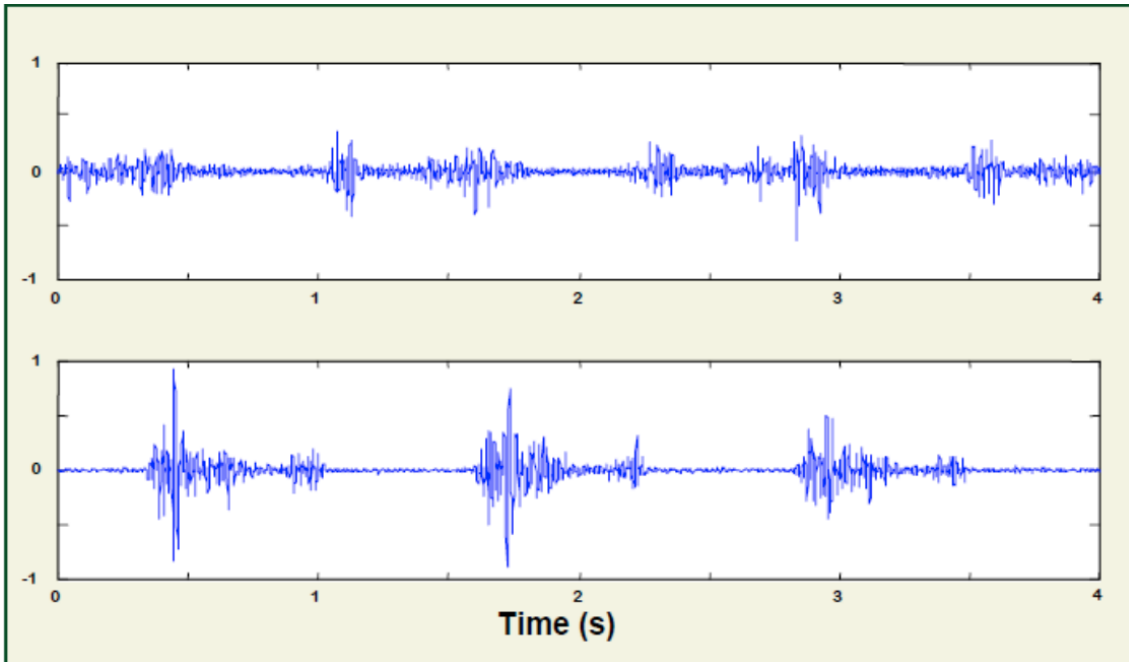


Figura 40. Dos señales EMG producido por la contracción del bíceps. La escala de tiempo es de 500ms por recuadro.

Debido a superposición de músculos, terminaciones nerviosas, etc. la señal EMG no es constante, de modo que la señal procesada solo puede ser analizada para evaluar cambios a corto plazo y en un solo músculo. De modo que, para poder realizar un análisis más exhaustivo, es necesario normalizar esta señal utilizando un valor de referencia obtenido en condiciones estandarizadas y reproducibles. A pesar de la importancia de esta normalización, no existe suficiente evidencia científica en la literatura para la obtención de una metodología uniforme.

La mayoría de estudios realizan el análisis de la modulación de amplitud con la envolvente de señal (rectificación y filtrado de paso bajo) o mediante la estimación del valor medio rectificado o medio de raíz con una ventana deslizante<sup>245</sup>. Sin embargo, estos valores no están apoyados por otros autores, debido a multitud de variables intervinientes que podría ser determinantes en los datos obtenidos<sup>246</sup>. Este sesgo puede ser reducido mediante el blanqueo de señal y el procesamiento multicanal<sup>245</sup>.

Por otro lado, otras variables como la relación entre la amplitud y el nivel de excitación dependen del patrón de activación de la unidad motora<sup>247</sup>, además de la ubicación del electrodo en relación con las zonas de inervación y las regiones del tendón y las

interferencias de otros músculos (*crosstalk*). Finalmente, Otros aspectos a tener en cuenta son las contracciones dinámicas, las propiedades del conductor de volumen<sup>248</sup> y el posicionamiento de los electrodos.

### Determinación de variables electromiográficas.

Para la valoración electromiográfica de este trabajo, se utilizó un electromiógrafo (EMG) FREEEMG 300 de la marca BTS Bioengineering®, Milán, Italia (figura 41). En este estudio se optó por electrodos superficiales, a pesar de ser la técnica de electrodos intramusculares el “gold standard”, ya que, se trata de una medición no invasiva y que, asimismo cuantifica de forma objetiva la actividad eléctrica muscular, además de una demostrada fiabilidad<sup>71</sup>.



Figura 41. FREE-EMG 300 (8 CANALES)

Se optó por el EMG de ocho canales, dado que la literatura no recomienda reducirlo a uno o dos, aconsejando como mínimo cuatro canales, de tal modo, que se pueda estudiar dos grupos musculares opuestos de forma bilateral<sup>71,249</sup>.

**- EMG modelo FREEEMG 300:** se trata de un sistema de sondas integradas, que se colocan en la piel a través de electrodos, de modo que registrarán la actividad eléctrica de la región anatómica que se quiera analizar. Al tratarse de un aparato con sensores inalámbricos, ofrece mayor libertad de movimiento y mayor reproducibilidad de la técnica.

Cada sensor va identificado con un número, de modo que mejora el análisis de los datos recogidos mediante un receptor conectado a un ordenador con un software

propio. Durante una fase de análisis de pueden utilizar a la vez hasta un total de 10 sondas.

Una vez montado y encendido el ordenador, se procedía a la aplicación de la técnica con el paciente.

- 1) Preparación del paciente. Se realizaba limpieza con alcohol 70° las zonas donde se iban a colocar los electrodos (bíceps, tríceps, cuádriceps y tibial anterior), además de dejarla libre de vello.
- 2) Colocación de los electrodos. Para correcta colocación de los electrodos, se siguió los estándares del protocolo SENIAM (Surface Electromyography for the Non-invasive Assessment of Muscles)<sup>250</sup>, de esa forma se conseguía la reproducibilidad.

Cabe recalcar, que esa técnica era siempre realizada por el mismo equipo fisioterapéutico y enfermero, a fin de evitar sesgos y conseguir una reproducibilidad de las muestras en cada valoración<sup>251</sup>. Se adhirieron bilateralmente electrodos de superficie de disco de Ag-AgCl bipolares desechables con un diámetro de 1 cm sobre 8 músculos a analizar, con una separación inter electrodos de 20mm.

- 3) Técnica. Tras la colocación de los electrodos (ya descrita), se adiestraba a los sujetos sobre cuál era el proceder de la prueba. Una vez seguros que se había comprendido en su totalidad se procedía al inicio de la misma. El orden secuencial del estudio fue: bíceps derecho, bíceps izquierdo, tríceps derecho, tríceps izquierdo, vasto interno derecho, vasto interno izquierdo, tibial anterior derecho y tibial anterior izquierdo. En cada uno de los músculos analizados se realizaron 5 repeticiones contra resistencia máxima instantánea, con un periodo de reposo de 5s entre cada contracción

Los pacientes realizaban la prueba en sedestación, dado que la mayoría de ellos acudían a los controles en silla de ruedas, resultando complicado realizar cualquier tipo de transferencia a una camilla, excepto para los ejercicios de extensión de la pierna en decúbito prono. La tarea requería que el sujeto permaneciera en decúbito prono mientras se recogía la actividad EMG durante 5s. Luego, el sujeto extendía su pierna derecha recta aproximadamente a quince centímetros de la mesa. La pierna se mantuvo isométrica durante 3s y luego se bajó a la mesa.

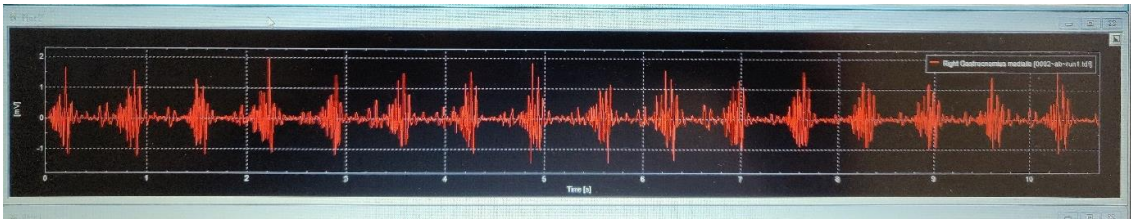


Figura 42. Ondas de EMG.

### **Parámetros electromiográficos.**

La señal EMG fue digitalizada con una frecuencia de muestreo de 1000Hz, posteriormente se le aplicó un filtro de paso de banda entre 20Hz y 250Hz<sup>252</sup>, sin procesar y se amplificó entre 1000 y 20.000 veces, según el sujeto. El amplificador tiene un CMRR de 10,000: 1 (Bortec EMG, Calgary AB, Canadá). La EMG sin procesar se filtró con paso de banda (10 y 1000 Hz) y se convirtió A / D a 2000 Hz utilizando un sistema de adquisición de datos de National Instruments.

Posteriormente, los datos fueron analizados por el método de raíz cuadrada media (RMS) que refleja la actividad fisiológica en la unidad motora durante contracción. El RMS representa la raíz cuadrada de la potencia media de la señal EMG para un período de tiempo determinado<sup>253</sup>.

### **❖ Análisis estadístico.**

El propósito del análisis fue determinar si existía un orden de activación consistente entre los sujetos. Este fue un análisis cualitativo simple para evaluar si los sujetos reclutan los músculos posteriores en el mismo orden. Se calculó para cada sujeto el promedio de los tiempos de aparición de los músculos para las 5 repeticiones para cada uno de los cinco músculos. Luego se determinó el orden de activación para cada sujeto y se realizó una evaluación cualitativa de cuántos sujetos tienen el mismo orden de reclutamiento. También se calculó el promedio del grupo y la desviación estándar de los tiempos de aparición del músculo para cada músculo. Se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico) con una prueba de Dunn post hoc para determinar si los tiempos de inicio promedio eran diferentes para cada grupo muscular.



4

# Resultados



## **4 Resultados**

---

### **4.1 Resultados estudio 1. Valoración de la calidad ósea. Densitómetro de calcáneo.**

La población total del estudio 1 sobre calidad ósea, fue de 99 individuos (33 pacientes con ELA y 66 controles sanos). La edad y las características antropométricas generales de la serie se muestran en la tabla VII, estratificadas por sexo. La proporción de hombres fue similar tanto en el grupo ELA como en el grupo control (63,6%), respecto a la de mujeres.

En el estudio comparativo entre sexos, se observaron diferencias significativas tanto en peso ( $p < 0,01$ ) como en IMC ( $p < 0,05$ ) entre el grupo control y el grupo ELA. Se observó que ambos sexos del grupo ELA, tuvieron menor peso e IMC que el grupo control, debido sobre todo a la diferencia entre ambos grupos referente al sexo masculino, donde fue significativa dicha diferencia. En el caso del sexo femenino no fue así ( $p < 0,01$  para peso y  $p < 0,05$  para IMC).

En cuanto a la variable de edad, los estudios revelaron que los hombres del grupo control eran un poco más jóvenes que los varones del grupo ELA. Por el contrario, las mujeres del grupo control eran mayores que las mujeres del grupo ELA, aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla VII. Edad y características antropométricas generales de grupo control y grupo ELA, discriminados por sexo.

	Grupo control Media $\pm$ DE (95% IC)				Grupo ELA Media $\pm$ DE (95% IC)				Comparación entre grupo control y ELA Z (o) Mann-Whitney U test		
	Muestra total (N=66)	Hombres (n=42)	Mujeres (n=24)	Muestra total (n=33)	Hombres (n=21)	Mujeres (n=12)	Muestra total	Hombres	Mujeres		
<b>Edad (años)</b>	54,6 $\pm$ 8,1 (52,6-56,7)	53,6 $\pm$ 7,2 (51,4-55,8)	56,5 $\pm$ 9,5 (52,5-60,5)	55,6 $\pm$ 10,6 (51,7-59,4)	56,3 $\pm$ 10,8 (51,2-61,4)	54,2 $\pm$ 10,4 (47,6-60,8)	-0,008 (0,994)	-0,482 (0,630)	-1,025 (0,305)		
<b>Peso (Kg)</b>	75,8 $\pm$ 12,6 (72,7-78,9)	82,4 $\pm$ 9,3 (79,5-85,3)	64,4 $\pm$ 8,9 (60,6-68,2)	69,0 $\pm$ 9,1 (65,7-72,2)	73,4 $\pm$ 7,6 (69,9-76,8)	61,2 $\pm$ 5,9 (57,4-65,0)	-2,629 (0,009)**	-3,401 (0,001)**	-0,672 (0,501)		
<b>Altura (cm)</b>	170,4 $\pm$ 8,4 (168,3-172,5)	174,8 $\pm$ 6,2 (172,9-176,8)	162,6 $\pm$ 5,5 (160,3-165,0)	168,3 $\pm$ 8,5 (165,3-171,4)	172,0 $\pm$ 7,1 (168,7-175,3)	162,3 $\pm$ 7,4 (157,6-167,1)	-1,198 (0,263)	-1,569 (0,117)	-0,286 (0,775)		
<b>IMC (Kg/cm<sup>2</sup>)</b>	26,0 $\pm$ 3,2 (25,2-26,8)	26,9 $\pm$ 2,7 (26,1-27,8)	24,3 $\pm$ 3,4 (22,9-25,8)	24,4 $\pm$ 2,7 (23,4-25,4)	25,1 $\pm$ 2,5 (23,9-26,2)	23,3 $\pm$ 2,8 (21,5-25,1)	-2,201 (0,028)*	-0,520 (0,021)*	-0,523 (0,603)		

\*p<0,05; \*\*p<0,01. **IMC**: índice masa corporal.

Al analizar los parámetros óseos QUS del sexo masculino entre ambos grupos, no se hallaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros (tabla VIII). A pesar de ello, se pudo observar que todos los parámetros óseos masculinos del grupo control eran ligeramente superiores al grupo ELA, especialmente en BUA, T-score y DMO estimada.

Sin embargo, en este mismo sentido, el análisis comparativo del sexo femenino entre ambos grupos, las mujeres del grupo ELA exhibieron valores más bajos estadísticamente significativos que las mujeres del grupo control en todos los parámetros óseos determinados.

Por otro lado, el análisis del T-score mediante QUS entre el grupo ELA y grupo control sin estratificar por sexos, el 51,5% del grupo ELA mostraron valores de osteopenia (T-score  $< -1,5$ ), frente a un 6,1%. Al estratificar por sexos, se vio que esos valores diferenciados de osteopenia se debían principalmente al sexo masculino

Las diferencias entre los grupos ELA y control en la proporción de individuos osteopénicos fue altamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Solo el 16,7% de las mujeres con ELA (2/12) tenían puntuaciones T-score indicativas de huesos sanos. Al comparar estos con el grupo control, se observó una diferencia significativa, mostrando que el sexo femenino del grupo ELA presentó valores de DMO mucho más bajos que las mujeres del grupo control ( $p = 0,001$ ).

Estos resultados de DMO indicaban que la mayoría de las mujeres del grupo ELA estaban dentro del rango de DMO considerado como osteoporosis (11/12), frente a las cuatro del grupo control ( $p < 0,0001$ ). En cuanto al sexo masculino, las diferencias en la proporción de varones osteoporóticos no fueron estadísticamente significativas entre los dos grupos (prueba exacta de Fisher,  $p = 0,468$ ).

Tabla VIII. Parámetros óseos de grupo control y grupo ELA mediante QUS.

	Grupo Control Media ± DE (95% IC)			Grupo ELA Media ± DE (95% IC)			Comparación hombres y mujeres Mann-Whitney U test		
	Total (n=66)	Hombres (n=42)	Mujeres (n=24)	Total (n=33)	Hombres (n=21)	Mujeres (n=12)	Total	Hombres	Mujeres
<b>BUA</b> (db/MHz)	128±12,7 (124,9-131,2)	131,6±12,9 (127,5-135,6)	121,8±9,9 (117,6-126,0)	113,9±22,5 (105,9-121,9)	121,2±21,5 (111,4-130,9)	101,2±19,2 (89,1-113,5)	-3,125 (0,002)**	-1,823 (0,068)	-3,290 (0,001)**
<b>SOS</b> (m/s)	1560,2±42,1 (1549,8-1570,6)	1566,7±47,5 (1551,9-1581,5)	1548,8±28,0 (1537,0-1560,7)	1539,7±59,5 (1518,6-1560,8)	1559,3±60,2 (1531,9-1586,8)	1505,3±40,8 (1479,3-1531,3)	-2,316 (0,021)*	-0,707 (0,479)	-3,121 (0,002)**
<b>I-Stiffness</b>	101,9±18,7 (97,3-106,5)	105,9±20,3 (99,6-112,3)	94,8±13,2 (89,2-100,4)	86,8±30,8 (75,9-97,8)	97,1±30,1 (83,3-110,8)	68,9±23,8 (53,7-84,0)	-2,754 (0,006)**	1,269 (0,205)	-3,323 (0,001)**
<b>T-Score</b>	0,3±1,2 (0,0-0,6)	0,4±1,4 (-0,1-0,8)	0,3±0,9 (-0,1-0,6)	-1,01±2,3 (-1,8 - -0,1)	-0,2±2,3 (-1,2-0,8)	-2,3±1,8 (-3,5 - -1,2)	-3,311 (0,001)**	-1,232 (0,218)	-3,897 (0,000)**
<b>DMO</b> (g/cm <sup>2</sup> )	0,689±0,136 (0,664-0,722)	0,715±0,151 (0,667-0,762)	0,643±0,092 (0,604-0,682)	0,599±0,209 (0,525-0,673)	0,669±0,207 (0,574-0,763)	0,477±0,153 (0,379-0,575)	-2,501 (0,012)*	-0,962 (0,336)	-3,255 (0,001)**

\*p<0,05; \*\*p<0,01, **BUA**: atenuación de amplitud de onda. **SOS**: velocidad de transmisión. **I-Stiffness**: índice de calidad. **DMO**: densidad mineral ósea.

En la tabla IX se resumen las valoraciones clínicas relacionadas con la funcionalidad ósea del grupo ELA, estratificado por sexos. Las mujeres con ELA mostraron puntuaciones ALSFRS-R e índice de Barthel ligeramente más bajo que los hombres, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se hallaron estas diferencias en FEV% (volumen espiratorio forzado) y porcentaje muscular. Sin embargo, las mujeres con ELA mostraron un porcentaje de grasa mayor que los hombres ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a los parámetros de laboratorio relacionados con la calidad ósea, los valores de  $Ca^{2+}$ , fosfatasa alcalina y TSH fueron bastante similares entre los grupos, estando dentro de rangos de normalidad. Sin embargo, los valores medios de Vit. D estaban en el límite inferior de normalidad, con un 44,4% de los pacientes mostrando niveles claros de hipovitaminosis D ( $< 20$  ng/mL). Sorprendentemente, los valores de T4 fueron más bajos en los hombres que en las mujeres ( $p < 0,05$ ), sin encontrar hallazgos significativos entre ellos.

Tabla IX. Perfiles clínicos y parámetros de laboratorio del grupo ELA.

	Pacientes ELA			Mann-Whitney U test
	Media ± DE (95% IC)	Hombres (n=21)	Mujeres (n=12)	
	<b>Muestra total (n=33)</b>			
<b>Tipo de ELA Espinal/Bulbar</b>	22 / 11	15 / 6	7 / 5	0.471**
<b>Duración síntomas (meses)</b>	24,1±17,8 (17,5-30,6)	28,1±19,6 (18,9-37,3)	16,9±11,4 (9,1-24,5)	-1,514 (0,130)
<b>ALSFRS-R</b>	34,9±8,8 (31,3-38,4)	34,4±10,1 (20,3-39,4)	36,1±5,2 (31,7-40,5)	-0,056 (0,978)
<b>Índice Barthel</b>	75,3±22,9 (63,8-86,7)	79,1±24,0 (63,9-94,4)	67,5±20,4 (46,0-88,9)	-1,100 (0,271)
<b>FEV%</b>	77,0±13,9 (68,9-85,0)	80,3±13,2 (70,8-89,7)	68,7±13,5 (47,4-90,3)	-1,346 (0,178)
<b>Grasa %</b>	18,2±3,8 (16,4-19,9)	16,9±2,8 (15,4-18,5)	21,1±4,8 (16,1-26,1)	-2,258 (0,024)*
<b>Músculo %</b>	36,8±3,1 (32,2-40,6)	37,0±2,8 (35,4-38,3)	36,4±3,9 (32,2-40,6)	-0,467 (0,640)
<b>Escala MRC fuerza muscular</b>	58,2±16,4 (50,7-65,7)	59,6±17,0 (49,7-69,3)	55,6±16,0 (40,7-70,3)	0,674 (0,500)
<b>Parámetros de laboratorio</b>				
<b>25-OH-Vit D (ng/mL)</b>	21,8±7,8 (15,8-27,8)	22,5±7,3 (15,6-29,3)	19,5±12,1 (9,1-28,2)	-0,586 (0,558)
<b>Calcio (mg/dL)</b>	9,4±0,3 (9,2-9,6)	9,5±0,2 (9,3-9,6)	9,3±0,5 (8,5-10,1)	0,568 (0,570)
<b>ALP (UI/L)</b>	64,3±21,1 (54,4-74,1)	65,1±22,3 (52,7-77,5)	61,8±18,7 (38,5-85,1)	-0,087 (0,930)
<b>T4 (µg/dl)</b>	1,9±2,3 (0,45-3,4)	1,1±0,2 (0,9-1,2)		-2,457 (0,014)*
<b>TSH mU/L</b>	1,6±0,6 (1,3-1,9)	1,7±0,5 (1,3-1,9)	1,5±0,8 (0,8-2,3)	-0,463 (0,663)

\*p<0,05. \*\* Test de la Chi cuadrado. **ALSFRS-R**: escala de calificación funcional de ELA. **MRC**: Escala de calificación del Consejo de Investigación Médica. **FEV**: volumen espiratorio forzado.

Respecto a la comparativa entre los tipos de ELA bulbar/espinal se obtuvieron resultados significativos para diferentes variables. Se obtuvo significación tanto en el índice de Barthel en ELA espinal ( $p < 0.05$ ), cómo mayor porcentaje de grasa ( $p < 0.05$ ), menor porcentaje de músculo ( $p < 0.01$ ) y niveles más bajos de TSH ( $p < 0.05$ ). Aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros óseos medidos.

Por otro lado, se observó una correlación positiva de la Vit. D con: BUA ( $r$  de Spearman: 0.867,  $p = 0.002$ ), SOS ( $r$ : 0.750,  $p = 0.020$ ), I-Stiffness ( $r$ : 0.783,  $p = 0.013$ ), T-score ( $r$ : 0.800,  $p = 0.010$ ) y DMO estimado ( $r$ : 0.783,  $p = 0.013$ ). Otra correlación hallada fue la de la TSH con: T-score ( $r$ : 0.470,  $p = 0.036$ ), I-Stiffness ( $r$ : 0.459,  $p = 0.042$ ) y BUA ( $r$ : 0.451,  $p = 0.046$ ). Para finalizar, el calcio sérico, fosfatasa alcalina y T4 no mostraron correlación con ninguno de los parámetros óseos (tabla X).

En cuanto a la comparativa, entre parámetros clínicos, metabólicos y óseos, en términos generales no hubo diferencias significativas entre ninguno de los parámetros analizados y las mediciones obtenidas por QUS, lo que indica que el perfil clínico de la ELA no tiene un impacto directo sobre la salud ósea en esta muestra. Sin embargo, dos pruebas de laboratorio, 25-OH-Vitamina D y TSH, sí que se relacionaron con parámetros de calidad ósea.

Tabla X. Características clínicas, de laboratorio y óseas del subtipo de ELA.

		Grupo ELA		Mann-Whitney U test
		Media ± DE (95% IC)		
	Bulbar (n=11)	Espinal (n=22)	Z (p)	
Duración síntomas (meses)	29,3±20,1 (13,8-44,7)	22,0±16,9 (14,5-29,4)	-1,071 (0,284)	
ALSFRS-R	36,7±6,5 (31,7-41,7)	33,9±9,9 (28,8-39,0)	-0,405 (0,685)	
Índice Barthel	94,0±13,4 (77,3-110,6)	68,1±22,0 (54,7-81,3)	<b>-2,265 (0,026)*</b>	
FEV%	74,4±13,6 (61,7-87,0)	79,5±14,7 (65,9-93,2)	-0,768 (0,442)	
IMC	24,2±2,4 (22,5-25,9)	24,7±2,8 (23,4-25,9)	-0,569 (0,589)	
Grasa %	15,1±3,2 (11,7-18,4)	19,4±3,5 (17,4-21,3)	<b>-2,180 (0,029)*</b>	
Músculo %	39,9±2,2 (37,6-42,2)	35,6±2,5 (34,2-37,1)	<b>-2,725 (0,006)**</b>	
MRC	73,0±7,1 (65,5-80,4)	52,3±15,3 (43,8-60,8)	<b>-2,618 (0,009)**</b>	
<b>Parámetros de laboratorio</b>				
25-OH-Vit D (ng/mL)	27,3±6,8 (16,4-38,2)	17,4±5,7 (10,4-24,5)	-1,715 (0,086)	
Calcio (mg/dL)	9,5±0,4 (9,0-9,9)	9,4±0,2 (9,2-9,6)	-0,453 (0,662)	
ALP (UI/L)	57,5±9,6 (47,4-67,5)	67,2±24,1 (53,2-81,2)	-1,279 (0,201)	
T4 (µg/dl)	1,2±0,2 (0,8-1,6)	2,1±2,6 (0,1-4,4)	-0,570 (0,575)	
TSH mU/ml	2,1±0,4 (1,6-2,5)	1,4±0,6 (1,1-1,7)	<b>-2,144 (0,032)*</b>	
<b>Parámetros óseos</b>				
I-Stiffness	86,8±33,7 (64,1-109,5)	86,9±30,1 (73,5-100,2)	-0,076 (0,939)	
BUA (db/MHz)	115,4±25,1 (98,5-132,4)	113,1±21,7 (103,5-122,8)	-0,229 (0,819)	
SOS (m/s)	1535,3±63,2 (1492,9-1577,8)	1541,8±58,9 (1515,3-1568,0)	-0,496 (0,620)	
T-score	-1,0±2,6 (-2,7-0,7)	-1,0±2,3 (-2,0-0,0)	-0,115 (0,909)	
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	0,592±0,226 (0,439-0,744)	0,602±0,205 (0,511-0,693)	-0,91 (0,849)	

\*p<0,05; \*\*p<0,01. ALSFRS-R: escala de calificación funcional de la esclerosis lateral amiotrófica. FEV: volumen espiratorio forzado. IMC: índice de masa corporal. MRC: Escala de calificación del Consejo de Investigación Médica. 25-OH-Vit D: 25-hidroxi vitamina D. ALP: fosfatasa alcalina. T4: tiroxina libre. TSH: hormona estimulante de la tiroides. DMO: densidad mineral ósea. I-Stiffness: índice de calidad. BUA: atenuación de amplitud de onda. SOS: velocidad de transmisión. DMO: densidad mineral ósea.

## 4.2 Resultados estudio 2. Valoración de la actividad cardíaca. Electrocardiograma.

La población total del estudio 2 sobre la actividad cardíaca, fue de 60 individuos (30 pacientes con ELA y 30 controles sanos). La edad y las características antropométricas generales de la serie se muestran en la tabla XI.

En la tabla podemos observar que la única diferencia estadísticamente significativa fue hallada en la variable peso, siendo este menor en el grupo ELA.

Las medias obtenidas en las variables de edad y altura, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en este estudio, mostrando ambas muestras valores homogéneos.

Tabla XI. Características de la población a estudio.

	<b>ELA</b> <b>Media ± DE</b> <b>(95% IC)</b>	<b>Control</b> <b>Media ± DE</b> <b>(95% IC)</b>	<b>Mann-Whitney</b> <b>U test</b> <b>Z (p)</b>
<b>Sexo masculino/femenino</b>	20/10	13/17	0,118
<b>Edad</b>	59,71 ± 10,99 (53,37-66,06)	57,34 ± 11,01 (53,16-61,53)	0,7756
<b>Peso</b>	69,3	76,85	<b>0,048*</b>
<b>Altura</b>	1,68	1,63	0,079

\*: p<0,05.

En cuanto al estudio de los valores métricos electrocardiográficos, no hemos encontrado diferencias significativas en ningún parámetro excepto en el intervalo QT que, aunque está dentro del rango de normalidad en ambas poblaciones, es significativamente superior en el grupo control. En este sentido cabe resaltar que, por lo que respecta al intervalo QTc Bazett, se observó que los valores mostrados en la tabla XII se encontraban en niveles dentro de la normalidad.

Adicionalmente pudimos observar que todas las variables relacionadas con la métrica del electrocardiograma tienden a ser menores en el grupo ELA, sin alcanzar significación estadística, excepto en el intervalo PQ y la FC, dejando el eje al margen.

Tabla XII. Variables métricas de los ECG's.

	<b>ELA</b> <b>Media ± DE</b> <b>(95% IC)</b>	<b>Control</b> <b>Media ± DE</b> <b>(95% IC)</b>	<b>Mann-Whithney</b> <b>U test</b> <b>Z (p)</b>
<b>Onda P (ms)</b>	105,38 ± 11,35 (101,06-109,7)	109,38 ± 8,21 (106,26-112,5)	0,205
<b>Intervalo PQ (ms)</b>	165,98 ± 23,37 (157,09-174,87)	155,72 ± 24,81 (146,29-165,6)	0,1009
<b>Complejo QRS (ms)</b>	94,80 ± 21,08 (86,93-102,67)	100,13 ± 20,36 (92,53-107,73)	0,248
<b>Intervalo QT (ms)</b>	369,29 ± 35,34 (356,09-382,49)	388,0 ± 29,57 (376,96-399,04)	<b>0,0215*</b>
<b>Intervalo QTc Bazett (ms)</b>	410,57 ± 26,71 (400,59-420,54)	414,70 ± 22,97 (406,12-423,28)	0,4825
<b>Eje QRS</b>	33,93 ± 35,44 (20,7-47,17)	19,63 ± 34,75 (6,66-32,61)	0,085
<b>FC (lpm)</b>	76,40 ± 16,70 (70,16-82,64)	69,53 ± 8,60 (66,32-72,74)	0,1858
<b>RR</b>	821,87 ± 156,26 (763,52-880,22)	867,93 ± 118,41 (823,72-912,15)	0,2739
<b>PP</b>	813,62 ± 165,42 (750,7-876,54)	876,21 ± 113,63 (832,98-919,43)	0,1525

\*: p<0,05. **ms**: milímetros por segundo. **FC**: frecuencia cardíaca. **lpm**: latidos por minuto

A grandes rasgos la diferencia entre los valores extremos métricos de las variables del grupo ELA presenta mayor dispersión respecto a su media que el grupo control (figura 43).

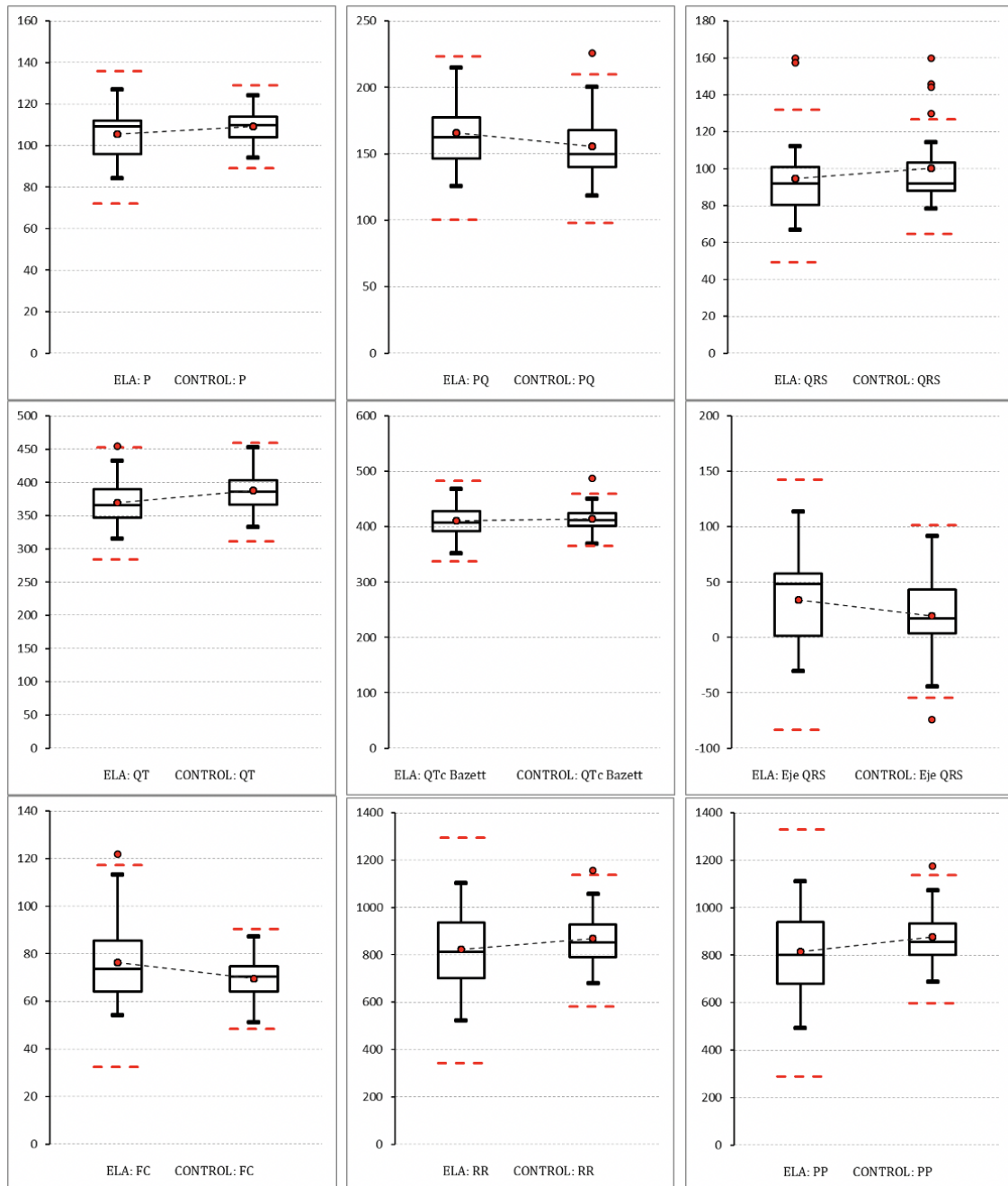


Figura 43. Diagrama de cajas, valores métricos medios de los electrocardiogramas.

Por lo que respecta a la interpretación de las alteraciones electrocardiográficas (tabla XIII), sólo se observó un caso de bloqueo AV de 1º, que se encontró en el grupo control, no siendo significativo este dato.

Por lo que respecta a los trastornos de conducción tampoco se hallaron diferencias significativas en ningún tipo de bloqueo de rama. Adicionalmente, llama la atención la observación de dos casos de BCRIHH en el grupo ELA, sugestivo de problemas estructurales cardíacos o degenerativos, frente a ningún caso del grupo control.

Estadísticamente, sólo hubo diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) en el hallazgo de alteraciones de la repolarización y en presencia de ondas Q anormales. En más profundidad, el apartado de alteraciones de la repolarización del grupo ELA tuvo más del triple de casos que el grupo control (16 Vs 5 casos), con  $P < 0,01$ . Y por lo respecta al apartado de ondas Q anormales, fue altamente significativa esta diferencia observando 17 casos en el grupo ELA y ninguno en el grupo control ( $p = 0,000$ ).

Para finalizar, el apartado de otros hallazgos no se halló valores estadísticamente significativos ni para AC X FA ni para bradicardia.

Tabla XIII. Alteraciones electrocardiográficas morfológicas.

	<b>ELA N=30 (%)</b>	<b>Control N=30 (%)</b>	<b>Test exacto de Fisher p</b>
<b>Bloqueo AV 1°</b>	0	1	1,000
<b>Trastornos de conducción</b>	4	5	1,000
• <b>BCRDHH</b>	2	4	0,670
• <b>BIRDHH</b>	0	1	1,000
• <b>BCRIHH</b>	2	0	0,491
<b>Alteraciones en repolarización</b>	16 (53,3)	5 (16,7%)	<b>0,0029**</b>
<b>Presencia de onda Q anormal</b>	17 (56,7%)	0 (0%)	<b>0,000**</b>
• <b>Anteroseptal</b>	8	0	
• <b>Inferior</b>	9	0	
<b>Otros hallazgos</b>	1 (3,3%)	5 (16,7%)	<b>0,195</b>
• <b>AC X FA</b>	1	2	<b>1,000</b>
• <b>Bradicardia</b>	0	3	<b>0,237</b>

\*\* :  $p < 0,01$ . ACxFA: Arritmia cardíaca por fibrilación auricular. BAV1°: Bloqueo auriculo-ventricular de primer grado. BCRDHH: bloqueo completo de rama derecha. BIRDHH: bloque incompleto rama derecha. BCRIHH: bloqueo completo rama izquierda.

### **4.3 Resultados estudio 3. Valoración electromiográfica de una intervención con EH301.**

En la valoración del estudio 3, se analizaron 20 individuos con ELA que fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos: grupo intervención a los que se les trató con EH301, y grupo placebo, siendo ambos grupos homogéneos, y no existiendo diferencias significativas entre ambos en el estudio antropométrico, duración de los síntomas o edad media (tabla XIV).

Aunque se hizo todo lo posible para aleatorizar ambos grupos, el pequeño tamaño de este estudio piloto junto con la heterogeneidad inherente de la enfermedad, mostraron algunas pequeñas diferencias en las mediciones de inicio. Como por ejemplo; en el estudio comparativo basal realizado en MRC y EMG de los músculos tibiales derechos, que mostrando diferencias significativas.

En cuanto al estudio comparativo, el grupo intervención mostró una disminución significativa de grasa y un leve aumento del peso muscular desde la medición basal a los 4 meses, efecto contrario ocurrido en el grupo placebo.

Tanto en la escala MRC, EMG como ALSFRS-R el valor basal medio fue menor en el grupo intervención que en el grupo placebo. Además, también tuvo una duración de los síntomas menor que el grupo placebo, pero no siendo significativo este último dato. A pesar de todo, estas diferencias deben de tenerse en cuenta al interpretar los datos, ya que, los resultados de estas medidas podrían estar influenciadas por pacientes que progresan más rápido.

Al realizar el estudio de ALSFRS-R, la comparativa realizada a los 4 meses mostró una mejoría significativa ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo placebo, a pesar de tener menor puntuación el grupo intervención en la medición basal. En este momento, el grupo placebo se había deteriorado significativamente en relación con sus medidas basales ( $p < 0,05$ ).

Tabla XIV. Características iniciales y cambio en las medidas de resultado después de 2 meses (2 M) y 4 meses (4 M) de tratamiento con ya sea placebo o EH301.

	Grupo EH301				Grupo Placebo			
	Inicio N=13	2M n=13	4 M n=10	Inicio N=14	2M n=14	4 M n=10		
<b>Características generales</b>								
Edad (años)	56,9 (9,1)			55,6 (10,5)				
Sexo (masculino/femenino)	9 / 4			8 / 6				
ELA Espinal / ELA Bulbar	10 / 3			10 / 4				
Duración de los síntomas (meses)	20,6 (12,5)			24 (9,6)				
Tratamiento con Riluzol	13			14				
<b>Mediciones</b>								
ALSFRS-R	38,8 (4,9)	42,4 (4,7)	41,3 (2,8)++	41,5 (5,2)	38,5 (6,0)	35,2 (3,1)*		
FVC (%)	95,3 (7,4)	101,4 (4,5)*++	97,2 (7,4)++	92,3 (2,6)	88,5 (9,5)	77,8 (10,0)**		
MRC scale index	40,6 (2,9)	50,1 (2,7)**++	57,4 (14,6)**++	45,5 (3,3)	35,6 (4,4)**	34,2 (6,6)**		
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	24,7 (3,7)	23,5 (2,3)	24,0 (2,0)	24,6 (2,1)	23,8 (1,9)	22,3 (2,4)*		
Peso grasa (Kg)	14,7 (3,6)	13,3 (3,7)	13,0 (4,2)	12,5 (3,8)	13,6 (4,5)	13,9 (4,0)		
Peso musculoesquelético (Kg)	24,4 (4,0)	24,8 (2,2)	24,9 (2,0)	26,3 (2,2)	25,8 (2,7)	25,0 (2,9)		
<b>Bíceps</b>								
D	285 (103)	292 (87)++	237 (77)	233 (87)	201 (56)	184 (46)		
I	264 (85)	288 (109)	276 (84)++	245 (91)	246 (101)	190 (38)		
<b>Tríceps</b>								
D	170 (66)	195 (74)+	212 (55)++	184 (53)	134 (71)*	126 (51)**		
I	234 (59)	250 (71)+	327 (74)**++	211 (77)	177 (65)	155 (45)		
<b>Cuádriceps</b>								
D	133 (36)	147 (75)	152 (50)	151 (46)	136 (44)	141 (35)		
I	138 (55)	148 (69)	148 (39)	177 (65)	146 (68)	133 (47)		
<b>Tibial</b>								
D	101 (57)	97 (50)	164 (44)**	167 (49)	135 (53)	125 (42)		
I	122 (57)	123 (68)	182 (56)**++	139 (50)	116 (55)	94 (33)		

**ALSFRS-R:** escala de calificación funcional de la esclerosis lateral amiotrófica — revisada. **IMC:** índice de masa corporal. **EMG:** electromiografía. **FVC:** capacidad vital forzada. **MRC:** Escala de calificación del Consejo de Investigación Médica. **D:** derecho. **I:** izquierdo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando una prueba t-test. —p <0,01: comparación de las características iniciales entre los participantes asignados al azar a EH301 frente al valor inicial; \* p <0,05, y \*\* p <0,01: comparación de mediciones 2M o 4M versus la línea de base (dentro del grupo diferencias); + p <0,05 y ++ p <0,01: comparación de pacientes con ELA tratados con EH301 versus placebo (diferencias entre grupos). Elaboración propia.

Al realizar el estudio comparativo de ALSFRS-R entre el valor basal y los valores a los 2 y 4 meses entre el grupo intervención y el grupo placebo, se observó una mejoría significativa ( $p < 0,01$ ) del grupo intervención (figura 44, i). Dicha mejoría corresponde a 3,4 puntos a los 2 meses y 2,5 a los 4 meses, en comparación con una disminución de 3 puntos a los 2 meses y 5,5 puntos a los 4 meses del grupo placebo.

Respecto a la FVC, se observó una mejoría a los 2 meses del grupo intervención de 6,1 puntos ( $\pm 5,3$ ), siendo significativa ( $p < 0,05$ ) en detrimento del grupo placebo que disminuyó 3,8% ( $\pm 12,1$ ). Al final del estudio, la diferencia entre ambos grupos fue de 19,4% (figura 44, ii).

Una desaceleración significativa de la enfermedad pudo observarse en el grupo intervención al analizar otras variables como, por ejemplo, la escala MRC, que mostró una mejoría significativa de 9,6 puntos ( $\pm 3,2$ ) ( $p < 0,01$ ) a los 2 meses respecto al grupo placebo, que disminuyó sus valores en 10 puntos ( $\pm 2,9$ ) (figura 44, iii), a pesar de que su resultado basal era más bajo. Esta inercia se mantuvo y hasta los 4 meses, siendo ya una diferencia de 23,2 puntos entre el grupo EH301 y el grupo placebo.

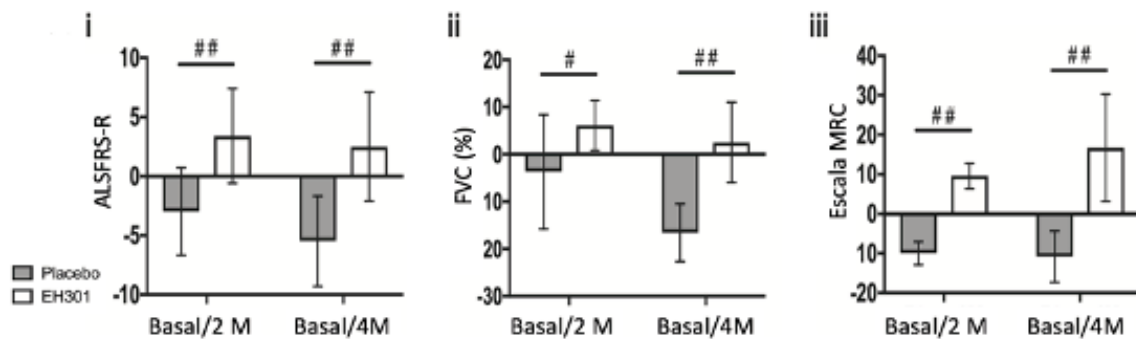


Figura 44. Principales criterios de valoración clínicos de los grupos a estudio.

Cambio medio de 2 meses (2 M) y 4 meses (4 M) desde el inicio (Basal) en las medidas de resultado en participantes de ELA tratados con placebo o EH301. Los datos son representativos de los pacientes que completaron las evaluaciones de seguimiento. Las barras de error representan la DE. **ALSFRS-R**: Escala de calificación funcional de la esclerosis lateral amiotrófica revisada. **FVC**: capacidad vital forzada. **MRC**: Investigación médica escala de calificación del consejo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando una prueba t. #  $p < 0,05$  y ##  $p < 0,01$ : comparación del cambio de 2 M o 4 M desde el valor inicial en EH301 frente a placebo.

En cuanto al estudio individualizado, se realizó una comparación de los datos basales y de los datos obtenidos a los 4 meses de las principales variables: MRC, FVC y ALSFRS-R. Por lo que respecta al ALSFRS-R, sólo hubo un paciente del grupo placebo que mejoró, empeorando el resto, no siendo así en el grupo intervención. Hablando del grupo intervención, de los 10 pacientes de este grupo, 7 mostraron una mejoría en puntuaciones ALSFRS-R, 6 mostraron mejoría en porcentaje FVC y otros 9 mostraron una mejoría en fuerza muscular medida por MRC (figura 45).

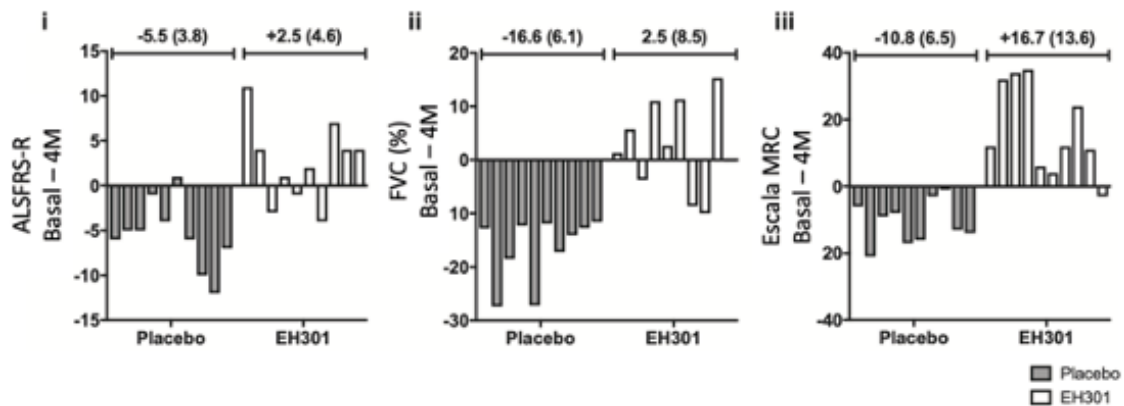


Figura 45. Principales criterios de valoración clínicos de los pacientes a estudio.

Resumen de los 4 meses de los participantes del estudio cambio desde la línea de base. Todos los participantes inscritos en el ensayo mostraron una respuesta positiva en al menos una de las medidas de resultado. Los datos son representativos de los pacientes que completaron las evaluaciones de seguimiento. **ALSFRS-R**: Escala de calificación funcional de la esclerosis lateral amiotrófica revisada. **FVC**: capacidad vital forzada. **MRC**: Investigación médica escala de calificación del consejo.

Como se ha visto en la tabla XIV, la evaluación de los grupos musculares mediante EMG reveló un aumento significativo del grupo intervención en tibial derecho (D) e izquierdo (I) y bíceps derecho (D) e izquierdo (I) a los 4 meses (tabla XIV).

Por lo que respecta al análisis prospectivo realizado a los 2 y 4 meses de todos los músculos, se halló un aumento en la actividad eléctrica del grupo intervención en 5 de los 8 músculos estudiados a los 2 meses.

Observando una diferencia significativa entre ambos grupos de los músculos: tríceps D y I, y tibial D y I (todos  $p < 0,01$ ) (figura 46).

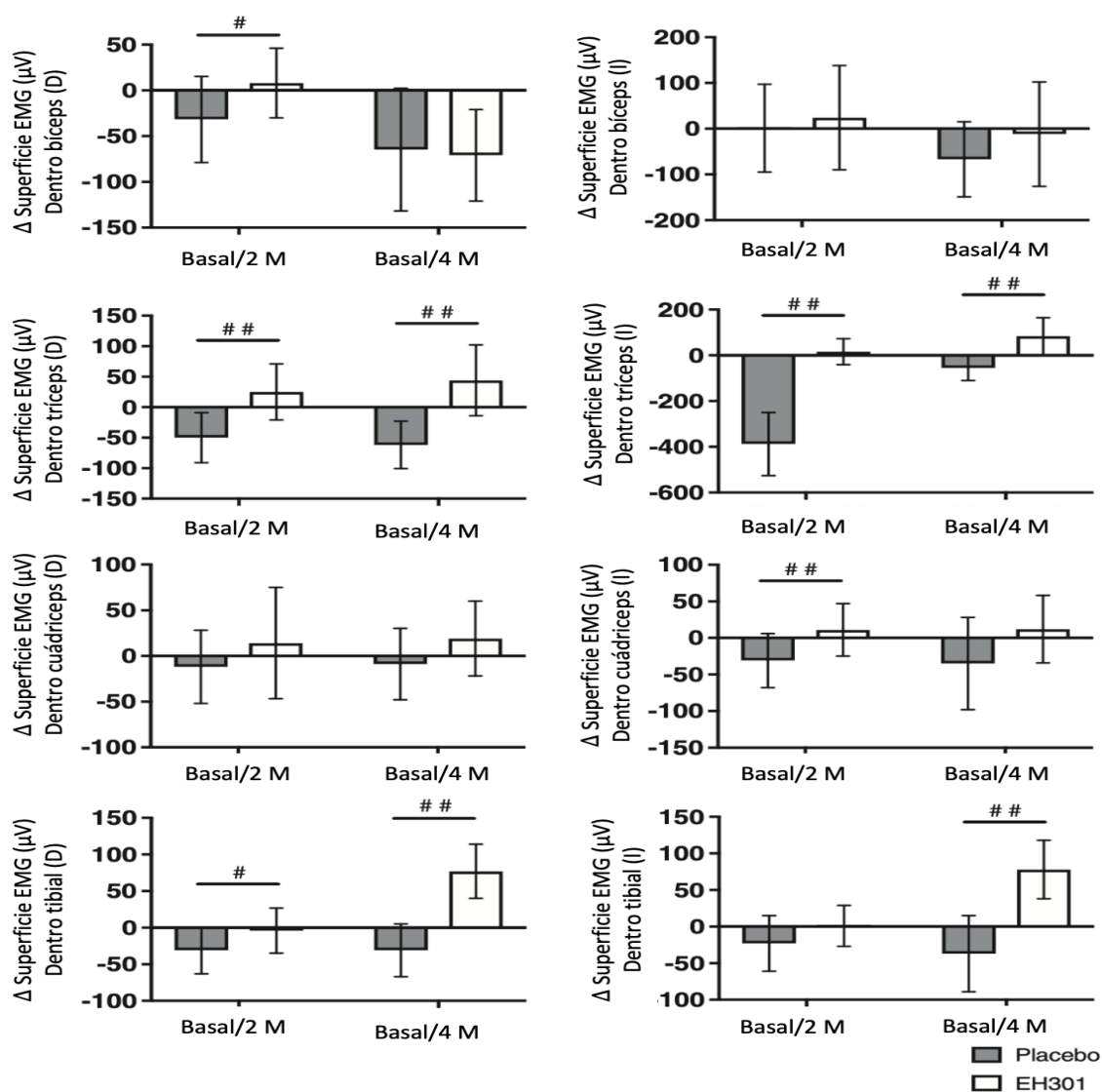


Figura 46. Cambios en la electromiografía (EMG) graficados por músculo (bíceps, tríceps, cuádriceps, tibial).

2 meses (2 M) y cambio medio de 4 meses (4 M) desde el valor inicial (Basal) en las medidas de resultado en los participantes con ELA tratados con placebo o EH301. **D:** derecha. **I:** izquierda. Datos son representativos de los pacientes que completaron las evaluaciones de seguimiento. Las barras de error representan la SD. Se realizaron análisis estadísticos usando una prueba t. #  $p < 0,05$  y ##  $p < 0,01$ : comparación del cambio de 2M o 4M desde el inicio en EH301 vs. placebo.

Por lo que refiere a efectos adversos (EA) incluyendo dolor de cabeza leve, dispepsia moderada y diarrea moderada, fueron informados por cuatro participantes en el grupo placebo y cinco participantes del grupo EH301 que completaron el estudio. Todos los EA fueron de corta duración con la recuperación completa del participante, puesto que también se presentaron los mismos EA en grupo placebo en la misma proporción, estos EA no se asociaron con la intervención.

5

# Discusión.



## 5 Discusión

---

### 5.1 Discusión estudio 1. Valoración de la calidad ósea. Densitómetro de calcáneo.

Una mala calidad ósea junto con el detrimento muscular, es indicativo de una progresión muy negativa y un deterioro más rápido<sup>254</sup>, por ello quisimos realizar un estudio descriptivo de los parámetros de calidad ósea de pacientes con ELA medidos por QUS, comparándolos con los de un grupo de individuos sanos emparejados en edad y variables antropométricas.

Existieron diferencias en los parámetros de calidad ósea entre el grupo ELA y el grupo control (tabla VIII). Curiosamente, los pacientes con ELA más jóvenes de esta serie mostraron valores estimados de DMO bastante similares a los encontrados en pacientes de mayor edad con ELA, revelando una falta de correlación entre la edad y la DMO, tal y como sería no habitual en población sin ELA.

Sin embargo, esta mala salud ósea detectada en el grupo de pacientes con ELA podría ser consecuencia de cambios en la dieta<sup>255</sup>, inactividad física<sup>256</sup>, falta de exposición al sol, uso de medicamentos u otras características desconocidas relacionadas con la enfermedad que no se abordaron en la investigación actual.

La mayor parte de la investigación experimental realizada por diferentes grupos sobre ELA son estudios *in vivo* utilizando el modelo de ratón SOD1G93A. Curiosamente, en este modelo animal de ELA se encontró una reducción en la masa ósea trabecular y cortical que reduce las propiedades mecánicas del hueso<sup>141</sup>, que se ha relacionado con una menor formación de hueso y una mayor resorción ósea. Además del deterioro de la función del músculo esquelético, estos hallazgos reflejan signos de fragilidad esquelética en modelos animales con ELA, como lo indican también las propiedades reducidas de flexión femoral y la resistencia a las fracturas en comparación con los ratones de control<sup>254</sup>. Este último estudio concluyó que la pérdida de masa ósea se debió a una menor formación de hueso y una mayor reabsorción. De manera similar, analizando el mismo modelo de ratones con ELA, se encontró en otro estudio una masa ósea reducida asociada con múltiples deterioros de las propiedades de los osteoblastos y una notable aceleración de la formación de osteoclastos en el hueso sólo en aquellos animales con atrofia muscular severa<sup>141</sup>.

Los resultados del presente estudio en pacientes con ELA están de acuerdo con estas observaciones previas en modelos animales de ELA y, por lo tanto, pueden tener importantes repercusiones para la práctica clínica. Los pacientes con ELA tienen una calidad ósea deficiente que se traduce en una fragilidad esquelética que aún no se comprende bien. Además de un conocimiento más profundo de los mecanismos subyacentes de la neurodegeneración, una posible interrelación músculo-hueso en ELA está ganando actualmente atención entre los investigadores<sup>143</sup>.

Diferentes estudios de casos y controles han descrito una asociación entre ELA y la aparición de fracturas<sup>257,258</sup>. Algunos de estos estudios incluyeron una combinación de pacientes con ELA y casos con atrofia muscular progresiva. Recientemente, un estudio prospectivo<sup>259</sup> mostró una asociación positiva entre ELA y la incidencia de fracturas, tanto osteoporóticas como no osteoporóticas y de origen tanto traumático como no traumático. La mayor incidencia de fracturas en pacientes con ELA sugiere una mala salud ósea, como un factor subyacente en varias enfermedades neurodegenerativas<sup>105,260-262</sup>.

Ninguno de nuestros pacientes con ELA informó fracturas antes del inicio del estudio. Dado que la mayoría de ellos presentaban una mala calidad ósea (tabla VIII) según la evaluación de QUS (menor SOS, menor BUA, menor I- Stiffnes, menor T-Score y menor DMO estimada), se podría valorar la realización de un estudio prospectivo sobre la aparición de fracturas en el futuro. En particular, las diferencias en las variables de calidad ósea solo fueron estadísticamente significativas en las mujeres, mostrando una mayor pérdida ósea que sus contrapartes sanas. Una explicación convincente de este deterioro óseo ligado al sexo que no implica el envejecimiento no está clara y merece más investigación. Siendo ésta una de las novedades del presente estudio: la influencia del sexo en las propiedades estructurales óseas en pacientes con ELA, particularmente en adultos jóvenes.

Este estudio, por lo tanto, confirma la hipótesis de que los pacientes con ELA pueden presentar un deterioro de la salud ósea con menor densidad ósea que los individuos sanos. Por lo tanto, estos cambios estructurales óseos no se pueden atribuir al proceso de envejecimiento.

Por otro lado, tal y como muestra la tabla X, el grupo de ELA se estratificó en 2 subtipos

(bulbar / medular). No se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos en cuanto a valoración QUS.

Actualmente, existe una evidencia creciente sobre la interacción que existe entre las fibras musculares la remodelación ósea<sup>263-267</sup>. Los músculos esqueléticos ofrecen estímulos anabólicos importantes para el recambio óseo a través de la liberación de factores de crecimiento osteogénicos, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1)<sup>80,268,269</sup>. Además, el mantenimiento de la homeostasis ósea está estrechamente relacionado con las células madre derivadas de los músculos<sup>270-272</sup>. Finalmente, desde una perspectiva del desarrollo morfológico, la carga mecánica de los huesos inducida por los músculos, además de regular la forma de los huesos, también está involucrada en aspectos cruciales de la morfogénesis ósea<sup>267-269,273,274</sup>. Sin embargo, los mecanismos moleculares básicos detrás de las posibles interacciones músculo-hueso aún no están claros. Por todo ello, sería conveniente realizar en futuros estudios, una valoración bioquímica centrándose en la estimación de biomarcadores más específicos de recambio óseo.

Esto podría explicarse porque la enfermedad de ELA se caracteriza por una atrofia muscular severa que teóricamente conduce a una reducción gradual de la carga mecánica sobre el esqueleto y, en consecuencia, a un trastorno de la remodelación y morfología ósea que puede ser importante a medida que avanza la enfermedad. La parálisis muscular en pacientes con ELA afecta rápidamente la función respiratoria y conduce a la muerte. Por lo tanto, el deterioro de la salud ósea en pacientes con ELA y su posible participación en la progresión de la enfermedad rara vez se han abordado en la literatura. Los pocos estudios clínicos sobre la calidad ósea en pacientes con ELA confirman que estos pacientes presentan una densidad mineral ósea disminuida, marcadores de recambio óseo sérico elevados y una mayor incidencia de fracturas<sup>260,275</sup>.

En estudios recientes, se detectó un aumento del recambio óseo en pacientes con ELA después de la medición de biomarcadores sanguíneos<sup>276</sup>. Además, en pacientes con ELA se observó una deficiencia de Vit. D que podría afectar la salud ósea, incluido el recambio óseo y la densidad mineral ósea<sup>105,260,261</sup>.

Aunque se analizaron niveles de Vit. D de los pacientes, no se midieron los marcadores específicos de recambio óseo como la osteocalcina, calcitonina, PTH, etc. por lo que no se pudo explorar la relación con estos biomarcadores.

En el presente estudio, los niveles de Vit. D se correlacionaron positivamente con todos los parámetros óseos analizados, incluso con la DMO estimada. Por lo que la suplementación con Vit. D también debe considerarse en aquellos pacientes con ELA con hipovitaminosis D, ya que en algunos estudios se describe una disminución retardada en la puntuación ALSFRS-R<sup>105,261</sup>. Por lo tanto, estos resultados enfatizan sobre la idea del monitoreo de la Vit. D en pacientes con ELA en términos de preservación de la salud ósea y prevención de fracturas.

La prevención de fracturas esqueléticas debería considerarse más ampliamente, ya que la aparición de fracturas podría afectar gravemente la calidad de vida en pacientes con ELA que sobreviven más tiempo. Los fármacos que inhiben la resorción ósea, como los bisfosfonatos o el denosumab, y los fármacos que promueven la formación de hueso, como la teriparatida, deben incluirse en el tratamiento habitual de los pacientes con ELA.

El presente estudio tiene obviamente algunas limitaciones, como ya se ha ido indicando. Primero, la cohorte incluyó casos prevalentes con más de 6 meses de síntomas que se incluyeron en una lista para iniciar un ensayo clínico aleatorizado (ECA) de un solo centro, por lo que la serie no incluyó casos recién diagnosticados. Sinceramente, creemos que esta cohorte de pacientes con ELA representó una verdadera muestra basada en la población. Una segunda limitación está relacionada con la técnica QUS que no mide directamente la DMO. Sin embargo, esta técnica no invasiva proporciona datos correlacionados con el método DEXA. Además, la técnica QUS es sensible a las diferencias en la porosidad ósea y las propiedades de la matriz entre individuos. Por otro lado, debe valorarse su portabilidad, ya que reduce el número de traslados de estos pacientes neurodegenerativos al hospital y la reducción de radiaciones ionizantes<sup>277</sup>. Independientemente de cierta variabilidad de los datos, se ha encontrado que BUA y SOS son valiosos para predecir el riesgo de fractura<sup>278</sup>.

En conclusión, este estudio confirma que los pacientes con ELA, especialmente las mujeres, presentan una salud ósea deteriorada con una densidad ósea más baja que las personas sanas. Estos cambios óseos estructurales son independientes del estado clínico y del subtipo de ELA, y no pueden atribuirse al proceso de envejecimiento. La salud ósea en los pacientes con ELA parece estar relacionada con ciertos parámetros metabólicos como los niveles de Vit. D y TSH, pero se requiere una investigación más profunda para determinar el impacto total de enfermedades neurodegenerativas como la ELA en el metabolismo óseo.

## **5.2 Discusión estudio 2. Valoración de la actividad cardíaca. Electrocardiograma.**

Las alteraciones electrocardiográficas podrían ser el causante de un final funesto en la enfermedad de ELA, a pesar de que la principal causa de muerte sea la insuficiencia respiratoria<sup>39</sup> por complicaciones pulmonares. Pero no debemos olvidar la estrecha relación existente entre el aparato circulatorio y el cardíaco. Ello podría ser explicado debido a las alteraciones existentes del sistema nervioso autónomo ya conocidas en esta enfermedad, posiblemente debidas a un proceso degenerativo que conlleva desajustes anatómicos y metabólicos. Por otra parte, estas alteraciones electrocardiográficas pueden ser debidas a la hipoxia miocárdica crónica como consecuencia del fallo del aparato respiratorio, provocando muerte celular y liberación de troponinas por parte de las células con angiograma normal<sup>279</sup>.

Es por ello que se realizó este estudio descriptivo, para analizar posibles alteraciones electrocardiográficas de pacientes con ELA y compararlas con los de un grupo de individuos sanos emparejados en edad. Cabe destacar que éste trabajo es el primero que analiza los electrocardiogramas en un grupo relativamente grande de pacientes con ELA, existiendo antecedentes en la bibliografía con un número bastante inferior de pacientes, o que van dirigidos en otra dirección (en la búsqueda bibliográfica solo se han encontrado estudios de casos clínicos).

Existieron diferencias significativas en cuanto al peso entre ambos grupos, siendo la media del grupo ELA menor que la media del grupo control (tabla XI). Esto puede ser explicado debido a la evolución de la propia enfermedad, que comporta síntomas como disfagia, anorexia, astenia y pérdida de peso<sup>38</sup>.

Cabe destacar la importancia de estudiar si existen diferencias respecto al sexo, ya que éste interfiere directamente en el resultado electrocardiográfico. Por ello, se procuró obtener la homogenización de la muestra del grupo control. Finalmente, no existieron diferencias significativas en cuanto a la proporción de sexos entre ambos grupos<sup>280-282</sup>.

Las mediciones de los segmentos e intervalos se han realizado en el grupo ELA de forma manual, con un procedimiento novedoso, como lo es el empleo de una lupa calibrada con divisiones de 0,1 mm y aunque se han medido 3 complejos consecutivos, calculándose la media, ello no excluye la posibilidad de errores en las mismas.

En cuanto a las variables métricas del electrocardiograma, sólo existieron diferencias significativas entre ambos grupos en la variable del intervalo QT. Esto podría ser el ejemplo visible de la denervación simpática cardíaca. Sin embargo, dado que esta diferencia es sólo en el intervalo QT y no en el intervalo QTc, no tendría relevancia clínica por sí sola<sup>283</sup>, ya que la predisposición a las arritmias potencialmente mortales está estrechamente ligadas a un aumento del QTc<sup>279</sup>. Por lo que podemos decir que no existen alteraciones electrocardiográficas clínicamente relevantes entre ambos grupos. Este hallazgo no está en concordancia con lo publicado por Martínez J. y cols.<sup>14</sup>, que hallaron que el intervalo QTc fue significativamente mayor en una paciente con ELA. Sería interesante ajustar a superficie corporal e incluso analizar también la amplitud del QRS (criterios de Sokolow y/o presencia de amplitud disminuida) ya que esto puede hablarnos de crecimiento ventricular o por el contrario disminución de la señal eléctrica<sup>284,285</sup>.

A pesar de no obtener diferencias significativas en ninguna variable métrica relevante, cabe destacar que todas las mediciones electrocardiográficas fueron menores en el grupo ELA que en el grupo control, a excepción del intervalo PQ, que fue mayor en el grupo de pacientes con ELA.

Como ya se ha mencionado, una de las características más importantes de los pacientes con ELA, es la alteración del SNA, relacionado con funciones homeostáticas como la regulación de la presión arterial, el control de temperatura, digestión y frecuencia cardíaca<sup>157</sup>. Curiosamente, en este estudio, el grupo ELA tuvo una FC media más alta que el grupo control, no llegando a ser diferencia significativa. Este aumento de la FC parece ser normal en pacientes con ELA, pudiendo ser el causante la hipoxemia y/o la mecánica ventilatoria<sup>286</sup>. No obstante, este fenómeno ha sido explicado en la literatura existente, mediante la disfunción del SNA que empieza con la retirada de los impulsos vagales, predominando el SNS, seguido de la denervación simpática y predominio vagal, de modo que, la monitorización de la FC podría ser un indicativo de la evolución de la enfermedad, pero no con la gravedad de esta<sup>287</sup>. Shemisa y cols.<sup>157</sup> describen la pérdida de la variabilidad de la FC en pacientes con ELA, de modo que aquellos pacientes con ELA avanzada, además de la disfunción autonómica cardiovascular y de los ganglios simpáticos de la medula espinal conocida como núcleo intermediolateral, también experimentan degeneración.

Por lo tanto, las alteraciones más comunes que se pueden encontrar en pacientes con ELA, serán aquellas provocadas por la degeneración del SNA a causa de la denervación simpática como: la bradicardia, prolongaciones del QT y taquicardia sinusal, entre otros<sup>279</sup>.

Del mismo modo, cuando la inervación cardíaca no se encuentra comprometida pero sí existe un desequilibrio entre el sistema nervioso simpático y el parasimpático, pueden presentarse anormalidades en el ritmo, contractilidad, función y conducción cardíaca. Al perderse el equilibrio entre ambos sistemas (simpático y parasimpático) se pierde la estabilidad eléctrica del corazón, siendo éste el posible motivo por el que cuando se presentan en enfermedades neurológicas, se puede producir un desequilibrio en la inervación cardíaca, pudiendo observar trastornos en el electrocardiograma<sup>145</sup>. Al contrario de lo que cabría esperar, en el presente estudio no se han hallado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a arritmias cardíacas (AC X FA) ni a trastornos de la conducción, a pesar de haberse observado dos BCRIHH en el grupo ELA y ninguno en el grupo control.

Sin embargo, sí que se hallaron estas diferencias estadísticamente significativas en cuanto a alteraciones en la repolarización ( $p < 0.01$ ) y en cuanto a la presencia de ondas Q anormales (17 en el grupo ELA Vs 0 en el grupo control).

Algunas de las alteraciones de la repolarización halladas en el grupo ELA, podrían ser equiparadas con isquemia subepicárdica o subendocárdica, pero el presente estudio no puede definir las como tal debido a que en muchos de los casos se desconocía si habían sido sometidos a técnicas de imagen de perfusión o electrocardiográficas más específicas. De todos modos, la denominación de alteraciones en la repolarización compatibles con isquemia, puede deberse a anomalías de la caja torácica o insuflación pulmonar. A pesar de ello, existe otra teoría que explica estas alteraciones de la repolarización mediante la estimulación del nervio periférico por según qué lado sea estimulado, ya que, cuando se presenta un aumento del tono simpático por estímulo del ganglio estrellado derecho, se observa elevación del segmento ST con ondas T negativas, compatible con isquemia subepicárdica. Por el contrario, cuando el tono simpático incrementado es por estímulo del ganglio estrellado izquierdo, se presenta infradesnivel del segmento ST con aumento en la amplitud de las ondas T y prolongación del intervalo QT, compatible con isquemia

subendocárdica<sup>279</sup>. En la literatura existen publicaciones que relacionan la prolongación del QT en pacientes con ELA con muerte súbita, siendo desconocidos los mecanismos que pueden causar la muerte súbita. Se especula que la fibrosis subendocárdica afecta la conducción cardíaca, los trastornos electrolíticos debido a alteración en las membranas celulares o la sobreestimulación simpática.

Por lo que se refiere al hallazgo estadísticamente significativo ( $p=0,000$ ) hallado en el presente estudio sobre la presencia de ondas Q, sería incorrecto referirse a estas como necrosis miocárdica como tal, dado que, para poder interpretar la presencia de necrosis, sería necesaria la elaboración de una historia clínica más completa y ser muy estrictos con los criterios para ser consideradas como “necrosis” en un electrocardiograma. Es por ello que nos hemos referido a estos hallazgos como “presencia de ondas Q anormales”. Este hallazgo podría ser interesante, ya que hablamos de un hallazgo inaudito en la bibliografía, de modo que, sería necesario un estudio más en profundidad con una historia clínica completa, además de la realización de un análisis de regresión para saber si hay otras variables que influyen sobre todo en la presencia d ondas Q.

Este estudio, por lo tanto, confirma la hipótesis de que los pacientes con ELA pueden presentar mayor número de anomalías electrocardiográficas que un grupo de controles sanos. De igual modo, estos cambios, no pueden ser atribuidos al proceso de envejecimiento y sí a la propia enfermedad de ELA.

Así mismo, el presente estudio demuestra la necesidad de una intervención multidisciplinar de la enfermedad de ELA, dado que en muchas ocasiones las manifestaciones cardiovasculares en estos pacientes son subestimadas. Cabe recordar que la ELA comienza con una interrupción vagal, seguido de la actividad simpática mejorada y denervación finalmente simpático con predominio vagal. Por ello puede interpretarse que el grado de disfunción autonómica puede dar información sobre el curso natural de la enfermedad<sup>157</sup>, pero no relacionarlo con la gravedad. En este sentido, una mejor comprensión de la disfunción autonómica en pacientes con ELA puede prevenir complicaciones cardiovasculares.

Finalmente, para futuras líneas de investigación al respecto, convendría realizar un análisis más exhaustivo con la realización de una buena historia clínica. No estaría de más completar los estudios electrocardiográficos con ecocardiografía seriada, a modo de

realizar un estudio cardiológico completo longitudinal en pacientes con ELA, además de el estudio de los niveles séricos de electrolitos, troponina, CK y CKMB, etc. ayudaría a mejorar el estudio.

En resumen, el presente estudio evidencia diferencias electrocardiográficas del tipo de trastornos de la repolarización y la presencia de bloqueos de rama izquierda en el grupo ELA. Estos trastornos de la repolarización, puede que sean secundarias a anomalías estructurales o funcionales tanto torácicas como pulmonares. Por lo que respecta a los bloqueos de rama izquierda, pueden sugerir procesos degenerativos del sistema de conducción que no se han podido estudiar en el presente trabajo, pero que sugieren la conveniencia de posteriores estudios en profundidad.

### **Discusión estudio 3. Valoración electromiográfica de una intervención con antioxidantes.**

El presente estudio muestra un efecto positivo del EH301 frente a la progresión de ELA, proporcionando así un apoyo para un estudio más amplio en un futuro. Este estudio muestra cómo los participantes tratados con EH301 obtuvieron una mejora en al menos una de las variables analizadas.

Es importante señalar que todos los participantes del estudio seguían tomando su medicación habitual, entre la que se encontraba riluzol. Este procedimiento es habitual en ensayos clínicos con pacientes de ELA. Tal y como se ha publicado, los ensayos han informado del uso de riluzol en el rango de 73%<sup>288</sup> a 91%<sup>289</sup>. Sin embargo, en el presente estudio, el cien por cien de los pacientes analizados informaron del uso de riluzol, en ambos grupos, por lo que los beneficios clínicos deben atribuirse al EH301.

Además, cabe destacar que ninguno de los pacientes del estudio tenía como tratamiento edaravona. Este fármaco ha demostrado aumentar la puntuación de la escala ALSFRS-R en un 33%, lo que se traduce en una mejoría de los síntomas a las 24 semanas de iniciar su tratamiento<sup>289</sup>. Sin embargo, en cuanto a EH301 ha demostrado en este estudio mejoras significativas a los cuatro meses de tratamiento en cuanto a función pulmonar, fuerza muscular y en la puntuación ALFRS-R.

Por otro lado, se observó un aumento significativo de la puntuación MRC a los dos meses, que se prolongó hasta los cuatro meses respecto a la puntuación basal, lo cual indica otra

mejoría del tratamiento con EH301. De modo similar ocurre con la FEV con aumento de 5% a los 2 meses, no manteniéndose a los cuatro meses y descendiendo, quedándose con una mejora de 2% respecto a la basal (figura 46). Sin embargo, la pequeña muestra del tamaño de nuestro estudio es insuficiente para lograr un resultado más exacto, y es necesaria una mayor investigación.

Ambos componentes de EH301 activan las SIRT (desacilasas dependientes de NAD<sup>+</sup>) que juegan un papel importante en la función mitocondrial<sup>290</sup>. Como se ha explicado en la introducción del presente trabajo, estudios recientes han demostrado que alteraciones mitocondriales pueden desempeñar papeles inesperados en enfermedades que no se pensaba que tuviesen relación con estos orgánulos. Por ejemplo, los defectos en la reparación del ADN mitocondrial conducen a síndromes de cáncer y también desencadenan defectos mitocondriales a través del agotamiento de NAD<sup>+</sup>, debido a la activación de las enzimas que lo consumen como son las poli [ADP-ribosa] polimerasa 1 y 2 (PARP1 y PARP2, respectivamente)<sup>291</sup>. Ésta inactiva las SIRT1, lo que resulta en una degradación mitocondrial, que a su vez, producen niveles excesivos (ROS)<sup>292</sup>. Por todo ello, se puede pensar que las deficiencias en NAD<sup>+</sup> y ATP, conducirían a un deterioro mitocondrial, con la consecuente producción de ROS.

Por todo lo descrito anteriormente, el presente trabajo sugiere que el combinado de EH301, puede ayudar a la funcionalidad de las mitocondrias, aumentando la producción de ATP y la disminución de ROS<sup>293</sup>.

Por lo que se refiere al 3,5-dimetoxi-40-hidroxi-trans-estilbeno (componente como ya se ha indicado de EH301), es sabido que puede cruzar la barrera hematoencefálica<sup>294</sup>. Además se ha de demostrado que aumenta la actividad del factor de transcripción que responde a estrés oxidativo Nrf2 nuclear<sup>295</sup>; un sensible factor de transcripción redox que está involucrado en la regulación transcripcional de muchos genes antioxidantes, incluyendo c-glutamato-cisteína ligasa, enzima limitante en la síntesis de GSH<sup>296</sup>. Por todo ello, es de destacar que el mantenimiento de GSH es esencial para proteger a las neuronas de la oxidación y estrés nitrosativo<sup>297</sup>.

Por lo tanto y para finalizar, el presente estudio piloto indica que EH301 puede ofrecer beneficios en el tratamiento de ELA. Los hallazgos de esta prueba piloto deben ser más validados en un ensayo de fase II más grande, para explorar la eficacia de EH301 con una mayor población.



6

**Conclusiones.**



## 6 Conclusiones

---

En relación a los objetivos planteados, y basándonos en el análisis de los datos científicos publicados en los últimos años y expuestos en el marco teórico, las conclusiones de esta tesis en relación con los objetivos son:

### **Objetivos estudio 1. Valoración de la calidad ósea. Densitómetro de calcáneo.**

1. Los pacientes con ELA tienen peor calidad ósea medida por QUS respecto a una población control sana con rango de edad similar.
  - 1.1. Los pacientes del sexo femenino del grupo ELA, obtuvieron peor calidad ósea en mediciones BUA, SOS e I-Stiffness.
  - 1.2. Sólo se hallaron diferencias significativas en T-score y DMO en la comparación del subgrupo femenino.
  - 1.3. No se hallaron diferencias significativa en la estratificación por subgrupo bulbar o medular del grup ELA.

**Objetivos del estudio 2. Valoración de la actividad cardíaca. Electrocardiograma.**

2. En la comparativa entre grupo ELA y grupo control, sólo se hallaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las alteraciones en la repolarización.

2.1. Al analizar las características de ambos grupos, se ha observado que ambos son homogéneos en cuanto edad y proporción entre sexos.

2.2. En cuanto al estudio métrico, sólo se hallaron diferencias significativas en el intervalo QT.

2.3. Por otro lado, en el estudio morfológico, sólo se hallaron diferencias significativas en cuanto a mayor número de alteraciones en la repolarización del grupo ELA.

2.4. Se ha observado una diferencia especialmente significativa en la presencia de ondas Q anormal en el grupo ELA, 56,7% frente a 0 del grupo control.

**Objetivos del estudio 3. Valoración electromiográfica de una intervención con antioxidantes.**

3. La intervención con EH301 en un grupo de pacientes con ELA, mejora la función muscular en comparación con un grupo de paciente con ELA tratados con un placebo.

**3.1.** Tras la intervención del grupo EH301 a los 2 meses, se observó una mejoría significativa en valores clínicos como FVC (%) y MRC y en los músculos bíceps derecho e izquierdo y tríceps derecho e izquierdo. Esta misma valoración a los 4 meses mostró mejoras significativas además de en estos mismos valores, en ALSFRS-R y músculos tibiales derecho e izquierdo.

**3.2.** Al analizar el grupo placebo a los 2 meses, se observó un empeoramiento significativo en MRC y tríceps derecho. En cuanto a la valoración a los 4 meses mostró además un empeoramiento significativo en ALFRS-R, FVC (%) e IMC.

**3.3.** El análisis comparativo entre el grupo intervención y el grupo placebo a los 2 meses mostró una mejoría en todas las mediciones tanto escalas de valoración como en los grupos musculares bíceps y tríceps. Esta misma comparación a los 4 meses mostró que además de incrementarse las mejorías mostradas a los 2 meses, también mejoró el grupo muscular tibial.

7

# Bibliografía.



## 7 Bibliografía

---

1. Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, et al. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*. 1995;14(6):1105-1116. doi:10.1016/0896-6273(95)90259-7
2. Barros LF, San Martín A, Sotelo-Hitschfeld T, et al. Small is fast: astrocytic glucose and lactate metabolism at cellular resolution. *Front Cell Neurosci*. 2013;7. doi:10.3389/fncel.2013.00027
3. Paoli A, Bianco A, Damiani E, Bosco G. Ketogenic Diet in Neuromuscular and Neurodegenerative Diseases. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-10. doi:10.1155/2014/474296
4. Józwiak S, Kossoff EH, Kotulska-Józwiak K. Dietary treatment of epilepsy: rebirth of an ancient treatment. *Neurol Neurochir Pol*. 2011;45(4):370-378. doi:10.1016/S0028-3843(14)60108-0
5. Ari C, Poff AM, Held HE, et al. Metabolic Therapy with Deanna Protocol Supplementation Delays Disease Progression and Extends Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Mouse Model. Borchelt DR, ed. *PLoS One*. 2014;9(7):e103526. doi:10.1371/journal.pone.0103526
6. Bonafede R, Mariotti R. ALS Pathogenesis and Therapeutic Approaches: The Role of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles. *Front Cell Neurosci*. 2017;11. doi:10.3389/fncel.2017.00080
7. Zhou J, Li A, Li X, Yi J. Dysregulated mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS signaling in skeletal muscle of ALS mouse model. *Arch Biochem Biophys*. 2019;663:249-258. doi:10.1016/j.abb.2019.01.024
8. Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE. Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annu Rev Neurosci*. 2010;33(1):409-440. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135722
9. Sathasivam S. Motor neurone disease: clinical features, diagnosis, diagnostic pitfalls and prognostic markers. *Singapore Med J*. 2010;51(5):367-372; quiz 373. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20593140>.
10. Squire JM, AL-Khayat HA, Harford JJ, et al. Modelling muscle motor conformations using low-angle X-ray diffraction. *IEE Proc - Nanobiotechnology*. 2003;150(3):103. doi:10.1049/ip-nbt:20031094
11. MANUEL M, ZYTNICKI D. ALPHA, BETA AND GAMMA MOTONEURONS: FUNCTIONAL DIVERSITY IN THE MOTOR SYSTEM'S FINAL PATHWAY. *J Integr Neurosci*. 2011;10(03):243-276. doi:10.1142/S0219635211002786
12. Iolascon G, Paoletta M, Liguori S, Curci C, Moretti A. Neuromuscular Diseases and Bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10. doi:10.3389/fendo.2019.00794
13. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 2001;344(22):1688-1700. doi:10.1056/NEJM200105313442207
14. Martínez J, Ramón C, Morís C, Pascual J, Morís G. Abnormal electrocardiogram in a patient with amyotrophic lateral sclerosis mimicking myocardial ischaemia. *World J Clin Cases*. 2014;2(6):211. doi:10.12998/wjcc.v2.i6.211
15. Foster LA, Salajegheh MK. Motor Neuron Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Am J Med*. 2019;132(1):32-37. doi:10.1016/j.amjmed.2018.07.012
16. plataforma afectados.
17. Talbot K. Motor neurone disease. *Postgrad Med J*. 2002;78(923):513-519. doi:10.1136/pmj.78.923.513
18. Abhinav K, Stanton B, Johnston C, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis in South-East England: A Population-Based Study. *Neuroepidemiology*. 2007;29(1-2):44-48. doi:10.1159/000108917
19. Fang F, Ingre C, Roos P, Kamel F, Piehl F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol*. February 2015:181. doi:10.2147/CLEP.S37505
20. Ajroud-Driss S, Siddique T. Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2015;1852(4):679-684. doi:10.1016/j.bbadis.2014.08.010

21. Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, et al. ANG mutations segregate with familial and “sporadic” amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 2006;38(4):411-413. doi:10.1038/ng1742
22. Valdmanis PN, Rouleau GA. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2008;70(2):144-152. doi:10.1212/01.wnl.0000296811.19811.db
23. Ticozzi N, Vance C, LeClerc AL, et al. Mutational analysis reveals the FUS homolog TAF15 as a candidate gene for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2011;156(3):285-290. doi:10.1002/ajmg.b.31158
24. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet.* 2011;377(9769):942-955. doi:10.1016/S0140-6736(10)61156-7
25. Hardiman O, van den Berg LH, Kiernan MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(11):639-649. doi:10.1038/nrneuro.2011.153
26. Kühnlein P, Gdynia H-J, Sperfeld A-D, et al. Diagnosis and treatment of bulbar symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008;4(7):366-374. doi:10.1038/ncpneuro0853
27. Vucic S, Kiernan MC. Abnormalities in cortical and peripheral excitability in flail arm variant amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg & Psychiatry.* 2007;78(8):849-852. doi:10.1136/jnnp.2006.105056
28. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2009;4(1):3. doi:10.1186/1750-1172-4-3
29. Manual de ELA en Español. <https://sites.google.com/site/plataformadeafectadosela/home/manuales/manual-2?tmpl=%2Fsystem%2Fapp%2Ftemplates%2Fprint%2F&showPrintDialog=1>. Accessed May 5, 2021.
30. Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: Early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve.* 2000;23(3):336-343. doi:10.1002/(SICI)1097-4598(200003)23:3<336::AID-MUS4>3.0.CO;2-L
31. Gordon PH, Cheng B, Katz IB, et al. The natural history of primary lateral sclerosis. *Neurology.* 2006;66(5):647-653. doi:10.1212/01.wnl.0000200962.94777.71
32. Ellis, A Simmons, JM Dawson, SCR Wi C. Distinct hyperintense MRI signal changes in the corticospinal tracts of a patient with motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler Other Mot Neuron Disord.* 2000;1(1):41-44. doi:10.1080/146608299750138777
33. Duffy JR, Peach RK, Strand EA. Progressive Apraxia of Speech as a Sign of Motor Neuron Disease. *Am J Speech-Language Pathol.* 2007;16(3):198-208. doi:10.1044/1058-0360(2007/025)
34. Singerman J, Lee L. Consistency of the Babinski reflex and its variants. *Eur J Neurol.* 2008;15(9):960-964. doi:10.1111/j.1468-1331.2008.02219.x
35. Salajegheh M, Bryan WW, Dalakas MC. The challenge of diagnosing ALS in patients with prior poliomyelitis. *Neurology.* 2006;67(6):1078-1079. doi:10.1212/01.wnl.0000237342.73436.f6
36. Kobayashi M, Ikeda K, Kinoshita M, Iwasaki Y. Amyotrophic lateral sclerosis with supranuclear ophthalmoplegia and rigidity. *Neurol Res.* 1999;21(7):661-664. doi:10.1080/01616412.1999.11740994
37. Leigh PN. The management of motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(90004):32iv - 47. doi:10.1136/jnnp.74.suppl\_4.iv32
38. Ferguson TA, Elman LB. Clinical presentation and diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroRehabilitation.* 2007;22(6):409-416. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18198425>.
39. Corcia P, Pradat P, Salachas F, et al. Causes of death in a post-mortem series of ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler.* 2008;9(1):59-62. doi:10.1080/17482960701656940
40. Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci.* 2001;191(1-2):3-9. doi:10.1016/S0022-510X(01)00630-X

41. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(4):385-390. doi:10.1136/jnnp.2009.183525
42. O'Toole O, Traynor BJ, Brennan P, et al. Epidemiology and clinical features of amyotrophic lateral sclerosis in Ireland between 1995 and 2004. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(1):30-32. doi:10.1136/jnnp.2007.117788
43. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, et al. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(1):6-11. doi:10.1136/jnnp.2006.104828
44. Huisman MHB, de Jong SW, van Doormaal PTC, et al. Population based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis using capture-recapture methodology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(10):1165-1170. doi:10.1136/jnnp.2011.244939
45. Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. In: ; 2016:225-238. doi:10.1016/B978-0-12-802973-2.00013-6
46. V&aacute;zquez MC, Ketzoi&aacute;n C, Legnani C, et al. Incidence and Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Uruguay: A Population-Based Study. *Neuroepidemiology*. 2008;30(2):105-111. doi:10.1159/000120023
47. Nelson LM, Matkin C, Longstreth WT, McGuire V. Population-Based Case-Control Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Western Washington State. II. Diet. *Am J Epidemiol*. 2000;151(2):164-173. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a010184
48. Forbes RB. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS/MND) in people aged 80 or over. *Age Ageing*. 2004;33(2):131-134. doi:10.1093/ageing/afh013
49. Leigh PN. Chapter 13 Amyotrophic lateral sclerosis. In: ; 2007:249-278. doi:10.1016/S0072-9752(07)80016-9
50. Gros-Louis F, Gaspar C, Rouleau GA. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2006;1762(11-12):956-972. doi:10.1016/j.bbdis.2006.01.004
51. Lavine L, Steele JC, Wolfe N, et al. Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex in southern Guam: is it disappearing? *Adv Neurol*. 1991;56:271-285. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1853763>.
52. Bradley WG, Mash DC. Beyond Guam: The cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009;10(sup2):7-20. doi:10.3109/17482960903286009
53. Kuzuhara S, Kokubo Y. Atypical parkinsonism of Japan: Amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan (Muro disease): An update. *Mov Disord*. 2005;20(S12):S108-S113. doi:10.1002/mds.20548
54. Mitchell J. Amyotrophic lateral sclerosis: toxins and environment. *Amyotroph Lateral Scler Other Mot Neuron Disord*. 2000;1(4):235-250. doi:10.1080/14660820050515061
55. Abel EL. Football Increases the Risk for Lou Gehrig's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Percept Mot Skills*. 2007;104(3\_suppl):1251-1254. doi:10.2466/pms.104.4.1251-1254
56. Al-Chalabi A. Trouble on the pitch: are professional football players at increased risk of developing amyotrophic lateral sclerosis? *Brain*. 2005;128(3):451-453. doi:10.1093/brain/awh426
57. Chio A. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain*. 2005;128(3):472-476. doi:10.1093/brain/awh373
58. Chen H, Richard M, Sandler DP, Umbach DM, Kamel F. Head Injury and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Am J Epidemiol*. 2007;166(7):810-816. doi:10.1093/aje/kwm153
59. Andersen PM, Abrahams S, Borasio GD, et al. EFNS guidelines on the Clinical Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis (MALS) - revised report of an EFNS task force. *Eur J Neurol*. 2012;19(3):360-375. doi:10.1111/j.1468-1331.2011.03501.x

60. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol.* 2008;119(3):497-503. doi:10.1016/j.clinph.2007.09.143
61. Brooks BR. El escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1994;124:96-107. doi:10.1016/0022-510X(94)90191-0
62. Kovacs GG. *Neuropathology of Neurodegenerative Diseases.* Cambridge: Cambridge University Press; 2014. doi:10.1017/CBO9781107588660
63. Mitsumoto H. Diagnosis and progression of ALS. *Neurology.* 1997;48(Issue 4, Supplement 4):2S-8S. doi:10.1212/WNL.48.4\_Suppl\_4.2S
64. Schrooten M, Smetcoren C, Robberecht W, Van Damme P. Benefit of the Awaji diagnostic algorithm for amyotrophic lateral sclerosis: A prospective study. *Ann Neurol.* 2011;70(1):79-83. doi:10.1002/ana.22380
65. Mills KR. Detecting fasciculations in amyotrophic lateral sclerosis: duration of observation required. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011;82(5):549-551. doi:10.1136/jnnp.2009.186833
66. Menon P, Geevasinga N, Yiannikas C, Howells J, Kiernan MC, Vucic S. Sensitivity and specificity of threshold tracking transcranial magnetic stimulation for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *Lancet Neurol.* 2015;14(5):478-484. doi:10.1016/S1474-4422(15)00014-9
67. Geevasinga N, Menon P, Yiannikas C, Kiernan MC, Vucic S. Diagnostic utility of cortical excitability studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 2014;21(12):1451-1457. doi:10.1111/ene.12422
68. Lunetta C, Lizio A, Maestri E, et al. Serum C-Reactive Protein as a Prognostic Biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2017;74(6):660. doi:10.1001/jamaneurol.2016.6179
69. Boxer AL, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Clinical, neuroimaging and neuropathological features of a new chromosome 9p-linked FTD-ALS family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011;82(2):196-203. doi:10.1136/jnnp.2009.204081
70. Costa J, Swash M, de Carvalho M. Awaji Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch Neurol.* 2012;69(11):1410. doi:10.1001/archneurol.2012.254
71. Criswell E. *Cram's Introduction to Surface Electromyography.* Second. (Criswell E, ed.). Canada: Jones and Bartlett Publishers; 2011.
72. Núria Massó \*, Ferran Rey, Dani Romero, Gabriel Gual LC y AG. Aplicaciones de la electromiografía de superficie en el deporte. *Apunt Med l'esport.* 2010;45:127-136.
73. Meekins GD, So Y, Quan D. American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine evidenced-based review: Use of surface electromyography in the diagnosis and study of neuromuscular disorders. *Muscle Nerve.* 2008;38(4):1219-1224. doi:10.1002/mus.21055
74. Chiou-Tan FY, Gilchrist JM. Repetitive nerve stimulation and single-fiber electromyography in the evaluation of patients with suspected myasthenia gravis or Lambert-Eaton myasthenic syndrome: Review of recent literature. *Muscle Nerve.* 2015;52(3):455-462. doi:10.1002/mus.24745
75. Ghaly B, Ghaly S. The Use of Neuromuscular Ultrasound and NCS/EMG Testing in the Differential Diagnosis of Carpal Tunnel Syndrome and Radiculopathy. *Neurodiagn J.* 2019;59(1):23-33. doi:10.1080/21646821.2018.1553873
76. Papagiannis GI, Triantafyllou AI, Roumpelakis IM, et al. Methodology of surface electromyography in gait analysis: review of the literature. *J Med Eng Technol.* 2019;43(1):59-65. doi:10.1080/03091902.2019.1609610
77. Joyce NC, Hache LP, Clemens PR. Bone Health and Associated Metabolic Complications in Neuromuscular Diseases. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2012;23(4):773-799. doi:10.1016/j.pmr.2012.08.005

78. Sassoli C, Pini A, Chellini F, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Stimulate Skeletal Myoblast Proliferation through the Paracrine Release of VEGF. Rameshwar P, ed. *PLoS One*. 2012;7(7):e37512. doi:10.1371/journal.pone.0037512
79. Ferrer Lozano Y. Matriz ósea y consolidación. *Medwave*. 2009;9(9). doi:10.5867/medwave.2009.09.4155
80. Hamrick MW, McNeil PL, Patterson SL. Role of muscle-derived growth factors in bone formation. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2010;10(1):64-70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190381>.
81. Zhou J, Yi J, Bonewald L. Muscle-Bone Crosstalk in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(5):274-279. doi:10.1007/s11914-015-0281-0
82. Qin Y, Peng Y, Zhao W, et al. Myostatin inhibits osteoblastic differentiation by suppressing osteocyte-derived exosomal microRNA-218: A novel mechanism in muscle-bone communication. *J Biol Chem*. 2017;292(26):11021-11033. doi:10.1074/jbc.M116.770941
83. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, et al. The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(39):12157-12162. doi:10.1073/pnas.1516622112
84. Pierroz DD, Bonnet N, Baldock PA, et al. Are osteoclasts needed for the bone anabolic response to parathyroid hormone? A study of intermittent parathyroid hormone with denosumab or alendronate in knock-in mice expressing humanized RANKL. *J Biol Chem*. 2010;285(36):28164-28173. doi:10.1074/jbc.M110.101964
85. Tu P-H, Liu Z-H, Lee S-T, Chen J-F. Treatment of repeated and multiple new-onset osteoporotic vertebral compression fractures with teriparatide. *J Clin Neurosci*. 2012;19(4):532-535. doi:10.1016/j.jocn.2011.04.048
86. Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest*. 1986;78(2):355-360. doi:10.1172/JCI112584
87. Behre HM, Kliesch S, Leifke E, Link TM, Nieschlag E. Long-term effect of testosterone therapy on bone mineral density in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(8):2386-2390. doi:10.1210/jcem.82.8.4163
88. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*. 2002;23(3):279-302. doi:10.1210/edrv.23.3.0465
89. Khosla S, Melton LJ, Riggs BL. Clinical review 144: Estrogen and the male skeleton. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(4):1443-1450. doi:10.1210/jcem.87.4.8417
90. Juul A. The effects of oestrogens on linear bone growth. *Hum Reprod Update*. 7(3):303-313. doi:10.1093/humupd/7.3.303
91. Chen H, Gilbert LC, Lu X, et al. A new regulator of osteoclastogenesis: estrogen response element-binding protein in bone. *J Bone Miner Res*. 2011;26(10):2537-2547. doi:10.1002/jbmr.456
92. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1092:385-396. doi:10.1196/annals.1365.035
93. Abe E, Sun L, Mechanick J, et al. Bone loss in thyroid disease: role of low TSH and high thyroid hormone. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1116:383-391. doi:10.1196/annals.1402.062
94. Xing W, Govoni KE, Donahue LR, et al. Genetic evidence that thyroid hormone is indispensable for prepubertal insulin-like growth factor-I expression and bone acquisition in mice. *J Bone Miner Res*. 2012;27(5):1067-1079. doi:10.1002/jbmr.1551
95. Rude RK, Gruber HE, Wei LY, Frausto A. Immunolocalization of RANKL is increased and OPG decreased during dietary magnesium deficiency in the rat. *Nutr Metab (Lond)*. 2005;2(1):24. doi:10.1186/1743-7075-2-24

96. Mizoguchi T, Nagasawa S, Takahashi N, Yagasaki H, Ito M. Dolomite supplementation improves bone metabolism through modulation of calcium-regulating hormone secretion in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(2):140-146. doi:10.1007/s00774-004-0552-9
97. Toba Y, Kajita Y, Masuyama R, Takada Y, Suzuki K, Aoe S. Dietary Magnesium Supplementation Affects Bone Metabolism and Dynamic Strength of Bone in Ovariectomized Rats. *J Nutr.* 2000;130(2):216-220. doi:10.1093/jn/130.2.216
98. Rude RK, Gruber HE, Norton HJ, Wei LY, Frausto A, Mills BG. Bone Loss Induced by Dietary Magnesium Reduction to 10% of the Nutrient Requirement in Rats Is Associated with Increased Release of Substance P and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *J Nutr.* 2004;134(1):79-85. doi:10.1093/jn/134.1.79
99. Rude RK, Gruber HE, Norton HJ, Wei LY, Frausto A, Kilburn J. Dietary magnesium reduction to 25% of nutrient requirement disrupts bone and mineral metabolism in the rat. *Bone.* 2005;37(2):211-219. doi:10.1016/j.bone.2005.04.005
100. Peters BSE AML. *Funciones Plenamente Reconocidas de Nutrientes Vitamina D*. 2nd ed. (Brasil IBILSI do, ed.). São Paulo - SP; 2015.
101. Banjabi AA, Al-Ghafari AB, Kumosani TA, Kannan K, Fallatah SM. Genetic influence of vitamin D receptor gene polymorphisms on osteoporosis risk. *Int J Health Sci (Qassim)*. 14(4):22-28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32694969>.
102. Reid IR, Bolland MJ, Grey A. Effects of vitamin D supplements on bone mineral density: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2014;383(9912):146-155. doi:10.1016/S0140-6736(13)61647-5
103. Juntas-Morales R, Pageot N, Marin G, et al. Low 25OH Vitamin D Blood Levels Are Independently Associated With Higher Amyotrophic Lateral Sclerosis Severity Scores: Results From a Prospective Study. *Front Neurol.* 2020;11. doi:10.3389/fneur.2020.00363
104. Bowser R, Turner MR, Shefner J. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: opportunities and limitations. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(11):631-638. doi:10.1038/nrneurol.2011.151
105. Camu W, Tremblier B, Plassot C, et al. Vitamin D confers protection to motoneurons and is a prognostic factor of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2014;35(5):1198-1205. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.005
106. Solomon JA, Gianforcaro A, Hamadeh MJ. Vitamin D3 Deficiency Differentially Affects Functional and Disease Outcomes in the G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Klein R, ed. *PLoS One.* 2011;6(12):e29354. doi:10.1371/journal.pone.0029354
107. Gianforcaro A, Hamadeh MJ. Dietary Vitamin D 3 Supplementation at 10 $\times$  the Adequate Intake Improves Functional Capacity in the G93A Transgenic Mouse Model of ALS, a Pilot Study. *CNS Neurosci Ther.* 2012;18(7):547-557. doi:10.1111/j.1755-5949.2012.00316.x
108. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010;9(6):599-612. doi:10.1016/S1474-4422(10)70086-7
109. Annweiler C, Rolland Y, Schott AM, et al. Higher Vitamin D Dietary Intake Is Associated With Lower Risk of Alzheimer's Disease: A 7-Year Follow-up. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci.* 2012;67(11):1205-1211. doi:10.1093/gerona/gls107
110. Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, et al. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009;10(5-6):310-323. doi:10.3109/17482960802566824
111. Luo X, Ou R, Dutta R, Tian Y, Xiong H, Shang H. Association Between Serum Vitamin D Levels and Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Neurol.* 2018;9. doi:10.3389/fneur.2018.00909
112. Smolders J, Torkildsen Ø, Camu W, Holmøy T. An Update on Vitamin D and Disease Activity in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs.* 2019;33(12):1187-1199. doi:10.1007/s40263-019-00674-8
113. Suzuki M, Yoshioka M, Hashimoto M, et al. 25-hydroxyvitamin D, vitamin D receptor gene polymorphisms, and severity of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012;27(2):264-271. doi:10.1002/mds.24016

114. Kojima G, Bell C, Abbott RD, et al. Low Dietary Vitamin D Predicts 34-Year Incident Stroke. *Stroke*. 2012;43(8):2163-2167. doi:10.1161/STROKEAHA.112.651752
115. Shih E, Lee W, Hsu J, Wang S, Fuh J. Effect of vitamin D on cognitive function and white matter hyperintensity in patients with mild Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int*. 2020;20(1):52-58. doi:10.1111/ggi.13821
116. Beck BR, Daly RM, Singh MAF, Taaffe DR. Exercise and Sports Science Australia (ESSA) position statement on exercise prescription for the prevention and management of osteoporosis. *J Sci Med Sport*. 2017;20(5):438-445. doi:10.1016/j.jsams.2016.10.001
117. Serre CM, Farlay D, Delmas PD, Chenu C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone*. 1999;25(6):623-629. doi:10.1016/s8756-3282(99)00215-x
118. Takeda S. Central control of bone remodelling. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(6):802-807. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01732.x
119. Chenu C. Glutamatergic innervation in bone. *Microsc Res Tech*. 2002;58(2):70-76. doi:10.1002/jemt.10120
120. Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000;100(2):197-207. doi:10.1016/s0092-8674(00)81558-5
121. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. *South Med J*. 2001;94(6):569-573. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11440324>.
122. Group report of a W scientific. *No TPrevention and Management of Osteoporosisitle*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
123. Melton LJ. The Prevalence of Osteoporosis: Gender and Racial Comparison. *Calcif Tissue Int*. 2001;69(4):179-181. doi:10.1007/s00223-001-1043-9
124. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX™ and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int*. 2008;19(4):385-397. doi:10.1007/s00198-007-0543-5
125. Gómez Vaquero C, Roig Vilaseca D. ¿Qué es el FRAX?: pros y contras. *Semin la Fund Española Reumatol*. 2010;11(3):100-106. doi:10.1016/j.semreu.2010.03.001
126. Fragilidad G de trabajo de la G de PC sobre O y P de F por. *Gu.a de Práctica Clínica Sobre Osteoporosis y Prevención de Fracturas Por Fragilidad*. (Ministerio de Ciencia e Innovación, ed.). GU.AS DE PRÁCTICA CLÍNICA EN EL SNS MINISTERIO DE SANIDAD, POLÍTICA SOCIAL E IGUALDAD; 2010.
127. Glüer CC, Eastell R, Reid DM, et al. Association of Five Quantitative Ultrasound Devices and Bone Densitometry With Osteoporotic Vertebral Fractures in a Population-Based Sample: The OPUS Study. *J Bone Miner Res*. 2004;19(5):782-793. doi:10.1359/jbmr.040304
128. Mikhail MB, Flaster E, Aloia JF. Stiffness in Discrimination of Patients with Vertebral Fractures. *Osteoporos Int*. 1999;9(1):24-28. doi:10.1007/s001980050112
129. Díez-Pérez A, González-Macías J, Marín F, et al. Prediction of absolute risk of non-spinal fractures using clinical risk factors and heel quantitative ultrasound. *Osteoporos Int*. 2007;18(5):629-639. doi:10.1007/s00198-006-0297-5
130. Fujiwara S, Sone T, Yamazaki K, et al. Heel bone ultrasound predicts non-spine fracture in Japanese men and women. *Osteoporos Int*. 2005;16(12):2107-2112. doi:10.1007/s00198-005-2008-z
131. Glüer CC, Cummings SR, Bauer DC, et al. Osteoporosis: association of recent fractures with quantitative US findings. *Radiology*. 1996;199(3):725-732. doi:10.1148/radiology.199.3.8637996
132. Durosier C, Hans D, Krieg MA, et al. Combining clinical factors and quantitative ultrasound improves the detection of women both at low and high risk for hip fracture. *Osteoporos Int*. 2007;18(12):1651-1659. doi:10.1007/s00198-007-0414-0

133. Huopio J, Kroger H, Honkanen R, Jurvelin J, Saarikoski S, Alhava E. Calcaneal ultrasound predicts early postmenopausal fractures as well as axial BMD. A prospective study of 422 women. *Osteoporos Int.* 2004;15(3):190-195. doi:10.1007/s00198-003-1534-9
134. Roos PM, Vesterberg O, Syversen T, Flaten TP, Nordberg M. Metal Concentrations in Cerebrospinal Fluid and Blood Plasma from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biol Trace Elem Res.* 2013;151(2):159-170. doi:10.1007/s12011-012-9547-x
135. Zheng W, Fu SX, Dydak U, Cowan DM. Biomarkers of manganese intoxication. *Neurotoxicology.* 2011;32(1):1-8. doi:10.1016/j.neuro.2010.10.002
136. Handy CR, Krudy C, Boulis N, Federici T. Pain in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Neglected Aspect of Disease. *Neurol Res Int.* 2011;2011:1-8. doi:10.1155/2011/403808
137. Degens H, Alway SE. Control of muscle size during disuse, disease, and aging. *Int J Sports Med.* 2006;27(2):94-99. doi:10.1055/s-2005-837571
138. Gross TS, Poliachik SL, Prasad J, Bain SD. The effect of muscle dysfunction on bone mass and morphology. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2010;10(1):25-34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190377>.
139. Panjabi MM. A hypothesis of chronic back pain: ligament subfailure injuries lead to muscle control dysfunction. *Eur Spine J.* 2006;15(5):668-676. doi:10.1007/s00586-005-0925-3
140. Peters TL, Weibull CE, Fang F, et al. Association of fractures with the incidence of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2017;18(5-6):419-425. doi:10.1080/21678421.2017.1300287
141. Zhu K, Yi J, Xiao Y, et al. Impaired Bone Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice with Muscle Atrophy. *J Biol Chem.* 2015;290(13):8081-8094. doi:10.1074/jbc.M114.603985
142. Neel BA, Lin Y, Pessin JE. Skeletal muscle autophagy: a new metabolic regulator. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(12):635-643. doi:10.1016/j.tem.2013.09.004
143. Koh S-H, Baik W, Noh MY, et al. The functional deficiency of bone marrow mesenchymal stromal cells in ALS patients is proportional to disease progression rate. *Exp Neurol.* 2012;233(1):472-480. doi:10.1016/j.expneurol.2011.11.021
144. Cho G-W, Noh M-Y, Kim HY, Koh S-H, Kim K-S, Kim SH. Bone Marrow-Derived Stromal Cells from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients Have Diminished Stem Cell Capacity. *Stem Cells Dev.* 2010;19(7):1035-1042. doi:10.1089/scd.2009.0453
145. CABRERA D.P. Trastornos electrocardiográficos en enfermedades neurológicas. *Rev Col Cardiol.* 2001;9:11-21.
146. Kawano H, Okada R, Yano K. Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. *Heart Vessels.* 2003;18(1):32-39. doi:10.1007/s003800300005
147. Shattock MJ, Tipton MJ. 'Autonomic conflict': a different way to die during cold water immersion? *J Physiol.* 2012;590(14):3219-3230. doi:10.1113/jphysiol.2012.229864
148. Hernando R. Función reguladora del arco reflejo presorreceptor sobre la vía simpática descendente. *Rev Mex Cardiol.* 2006;17(3):127-131.
149. ATAÍDE, A. M. M.; BRANDÃO, B. R.; PACHECO, C. L.; CALHEIROS, D. E.; OLIVEIRA, G. J. P. L.; NETO BL. S, C. F. & OLAVE E. Topographic and biometric study of the cervicothoracic ganglion (Stellate Ganglion). *Int J Morphol.* 2008;26(2):451-455.
150. García-Morán E, Sandín-Fuentes MG, Álvarez López JC, Duro-Aguado I, Urueña-Martínez N, Hernández-Luis C. Tormenta arrítmica secundaria a infarto agudo de miocardio e insuficiencia cardíaca tratada mediante bloqueo de ganglio estrellado izquierdo. *Rev Española Cardiol.* 2013;66(7):595-597. doi:10.1016/j.recesp.2013.01.016
151. Benites DC, Rojas Espinoza M AO. Reporte de caso: bloqueo del ganglio estrellado para manejo de la tormenta eléctrica. *Rev Chil Anest.* 2019;48:370-373.

152. Pérez FA MH. Alteraciones electrocardiográficas en pacientes con hemorragia intracerebral espontánea. *Rev Habanera Ciencias Médicas*. 2016;15(1):27-39.
153. F B-F. Reinervación cardíaca tras trasplante cardíaco. Valoración clínica, funcional e isotópica en el primer año tras trasplante. 2013.
154. Shivkumar K, Ajjjola OA, Anand I, et al. Clinical neurocardiology defining the value of neuroscience-based cardiovascular therapeutics. *J Physiol*. 2016;594(14):3911-3954. doi:10.1113/JP271870
155. Goldstein LB, El Hussein N. Neurología y cardiología: puntos de contacto. *Rev Española Cardiol*. 2011;64(4):319-327. doi:10.1016/j.recesp.2010.12.004
156. Borys Surawicz TK. *Chou's Electrocardiography in Clinical Practice*. 7th ed. (Elsevier S, ed.). Philadelphia: Saunders ELSEVIER; 2008.
157. Shemisa K, Kaelber D, Parikh SA, Mackall JA. Autonomic etiology of heart block in amyotrophic lateral sclerosis: a case report. *J Med Case Rep*. 2014;8(1):224. doi:10.1186/1752-1947-8-224
158. Pavlovic S, Stevic Z, Milovanovic B, et al. Impairment of cardiac autonomic control in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010;11(3):272-276. doi:10.3109/17482960903390855
159. Asai H, Hirano M, Udaka F, et al. Sympathetic disturbances increase risk of sudden cardiac arrest in sporadic ALS. *J Neurol Sci*. 2007;254(1-2):78-83. doi:10.1016/j.jns.2007.01.007
160. Li A-H, Hsu K-L, Liao C-S, Tseng Y-Z, Lee Y-T. Amyotrophic Lateral Sclerosis with a 'Pseudo-Infarction' Pattern on the Electrocardiograph. *Cardiology*. 2000;93(1-2):133-136. doi:10.1159/000007016
161. Finsterer J, Stöllberger C, Maeztu C. Sudden cardiac death in neuromuscular disorders. *Int J Cardiol*. 2016;203:508-515. doi:10.1016/j.ijcard.2015.10.176
162. Khandoker AH, Imam MH, Couderc J, Palaniswami M, Jelinek HF. QT Variability Index Changes With Severity of Cardiovascular Autonomic Neuropathy. *IEEE Trans Inf Technol Biomed*. 2012;16(5):900-906. doi:10.1109/TITB.2012.2205010
163. Yu Y, Hayashi S, Cai X, et al. Pu-Erh Tea Extract Induces the Degradation of FET Family Proteins Involved in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-12. doi:10.1155/2014/254680
164. Morozova N, Weisskopf MG, McCullough ML, et al. Diet and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Epidemiology*. 2008;19(2):324-337. doi:10.1097/EDE.0b013e3181632c5d
165. Chen Y-Z, Bennett CL, Huynh HM, et al. DNA/RNA Helicase Gene Mutations in a Form of Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet*. 2004;74(6):1128-1135. doi:10.1086/421054
166. Beghi E, Logroscino G, Chiò A, 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):289-292. doi:10.3109/17482960903384283
167. Chio A. A cross sectional study on determinants of quality of life in ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(11):1597-1601. doi:10.1136/jnnp.2003.033100
168. Turner MR, Wotton C, Talbot K, Goldacre MJ. Cardiovascular fitness as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: indirect evidence from record linkage study: Table 1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(4):395-398. doi:10.1136/jnnp-2011-301161
169. MG W. Environmental and Molecular Mutagenesis. In: Wiley Blackwell, ed. 55th ed. NJ USA; 2014:S25.
170. Simkó M, Mattsson M-O. Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: Possible immune cell activation. *J Cell Biochem*. 2004;93(1):83-92. doi:10.1002/jcb.20198

171. Martínez-Sámano J, Torres-Durán P V., Juárez-Oropeza MA, Verdugo-Díaz L. Effect of Acute Extremely Low Frequency Electromagnetic Field Exposure on the Antioxidant Status and Lipid Levels in Rat Brain. *Arch Med Res.* 2012;43(3):183-189. doi:10.1016/j.arcmed.2012.04.003
172. Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(5):629-641. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018
173. Phillips JL, Ivaschuk O, Ishida-Jones T, Jones RA, Campbell-Beachler M, Haggren W. DNA damage in Molt-4 T-lymphoblastoid cells exposed to cellular telephone radiofrequency fields in vitro. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 1998;45(1):103-110. doi:10.1016/S0302-4598(98)00074-9
174. Zhou H, Chen G, Chen C, Yu Y, Xu Z. Association between Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields Occupations and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. Akiba S, ed. *PLoS One.* 2012;7(11):e48354. doi:10.1371/journal.pone.0048354
175. Wang W, Zhang F, Li L, et al. MFN2 Couples Glutamate Excitotoxicity and Mitochondrial Dysfunction in Motor Neurons\*. *J Biol Chem.* 2015;290(1):168-182. doi:10.1074/jbc.M114.617167
176. Weiskopf MG, Morozova N, O'Reilly EJ, et al. Prospective study of chemical exposures and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(5):558-561. doi:10.1136/jnnp.2008.156976
177. Veldink JH, Kalmijn S, Groeneveld G-J, et al. Intake of polyunsaturated fatty acids and vitamin E reduces the risk of developing amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;78(4):367-371. doi:10.1136/jnnp.2005.083378
178. Yasuo Iwasaki BSP, Ken Ikeda BSP, Masao Kinoshita BSP. Molecular and Cellular Mechanism of Glutamate Receptors in Relation to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Drug Target -CNS Neurol Disord.* 2002;1(5):511-518. doi:10.2174/1568007023339021
179. Din JN. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease--fishing for a natural treatment. *BMJ.* 2004;328(7430):30-35. doi:10.1136/bmj.328.7430.30
180. Aguilera N, Balarío C, Bertoti A DVE. *Consenso Argentino Para El Diagnostico y Tratamiento de La Esclerosis Lateral Amiotrófica. Guía Práctica Clínica.*
181. Dangoumau A, Verschueren A, Hammouche E, et al. A novel SOD1 mutation p.V31A identified with a slowly progressive form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2014;35(1):266.e1-266.e4. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.012
182. Forsberg K, Andersen PM, Marklund SL, Brännström T. Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2011;121(5):623-634. doi:10.1007/s00401-011-0805-3
183. Magrané J, Manfredi G. Mitochondrial Function, Morphology, and Axonal Transport in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(7):1615-1626. doi:10.1089/ars.2009.2604
184. Mitumoto H, Factor-Litvak P, Andrews H, et al. ALS Multicenter Cohort Study of Oxidative Stress (ALS COSMOS): Study methodology, recruitment, and baseline demographic and disease characteristics. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2014;15(3-4):192-203. doi:10.3109/21678421.2013.864312
185. Spencer JPE, Jenner A, Butler J, et al. Evaluation of the Pro-Oxidant and Antioxidant Actions of L-DOPA and Dopamine in Vitro: Implications for Parkinson's Disease. *Free Radic Res.* 1996;24(2):95-105. doi:10.3109/10715769609088005
186. Wang H, O'Reilly EJ, Weiskopf MG, et al. Vitamin E Intake and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Pooled Analysis of Data From 5 Prospective Cohort Studies. *Am J Epidemiol.* 2011;173(6):595-602. doi:10.1093/aje/kwq416
187. Sundaram R, Gowtham L NB. The role of excitatory neurotransmitter glutamate in brain physiology and pathology. *Asian J Pharm Clin Res.* 1012;5:1-7.
188. Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Hediger MA. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci.* 1999;2(5):427-433. doi:10.1038/8091

189. Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci.* 2014;37(8):433-442. doi:10.1016/j.tins.2014.05.006
190. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol.* 2009;187(6):761-772. doi:10.1083/jcb.200908164
191. Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76(8):1046-1057. doi:10.1136/jnnp.2004.048652
192. Chung MJ, Suh Y-L. Ultrastructural Changes of Mitochondria in the Skeletal Muscle of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ultrastruct Pathol.* 2002;26(1):3-7. doi:10.1080/01913120252934260
193. Sasaki S, Iwata M. Mitochondrial Alterations in the Spinal Cord of Patients With Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007;66(1):10-16. doi:10.1097/nen.0b013e31802c396b
194. Liu J, Lillo C, Jonsson PA, et al. Toxicity of Familial ALS-Linked SOD1 Mutants from Selective Recruitment to Spinal Mitochondria. *Neuron.* 2004;43(1):5-17. doi:10.1016/j.neuron.2004.06.016
195. Palomo GM, Manfredi G. Exploring new pathways of neurodegeneration in ALS: The role of mitochondria quality control. *Brain Res.* 2015;1607:36-46. doi:10.1016/j.brainres.2014.09.065
196. Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishigaki S, Tanaka F, Sobue G. Disruption of Axonal Transport in Motor Neuron Diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13(1):1225-1238. doi:10.3390/ijms13011225
197. Cantó C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD<sup>+</sup> Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab.* 2015;22(1):31-53. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.023
198. Massudi H, Grant R, Guillemin GJ, Braidy N. NAD<sup>+</sup> metabolism and oxidative stress: the golden nucleotide on a crown of thorns. *Redox Rep.* 2012;17(1):28-46. doi:10.1179/1351000212Y.0000000001
199. Mehmel M, Jovanović N, Spitz U. Nicotinamide Riboside—The Current State of Research and Therapeutic Uses. *Nutrients.* 2020;12(6):1616. doi:10.3390/nu12061616
200. GUTTERIDGE JMC, HALLIWELL B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;899(1):136-147. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x
201. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción).* 2006;(494). doi:10.4067/S0718-04622006000200010
202. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36(1):83-106. doi:10.1146/annurev.pa.36.040196.000503
203. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res.* 2017;39(1):73-82. doi:10.1080/01616412.2016.1251711
204. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(2):532-553. doi:10.1159/000485089
205. Uttara B, Singh A, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(1):65-74. doi:10.2174/157015909787602823
206. Yuan S, Zhang Z-W, Li Z-L. Cell Death-Autophagy Loop and Glutamate-Glutamine Cycle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci.* 2017;10. doi:10.3389/fnmol.2017.00231
207. Quiñones M, Miguel M AA. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2012;27(1):76-89.
208. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231-1246. doi:10.3390/nu2121231

209. Hu B, Liu X, Zhang C, Zeng X. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *J Food Drug Anal.* 2017;25(1):3-15. doi:10.1016/j.jfda.2016.11.004
210. Estrela JM, Mena S, Obrador E, et al. Polyphenolic Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy: Bioavailability versus Bioefficacy. *J Med Chem.* 2017;60(23):9413-9436. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01026
211. Gerhardt E, Gräber S, Szegő ÉM, et al. Idebenone and Resveratrol Extend Lifespan and Improve Motor Function of HtrA2 Knockout Mice. Pandey S, ed. *PLoS One.* 2011;6(12):e28855. doi:10.1371/journal.pone.0028855
212. Mancuso R, del Valle J, Modol L, et al. Resveratrol Improves Motoneuron Function and Extends Survival in SOD1G93A ALS Mice. *Neurotherapeutics.* January 2014. doi:10.1007/s13311-013-0253-y
213. Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients.* 2016;8(5):250. doi:10.3390/nu8050250
214. Ferrer P, Asensi M, Segarra R, et al. Association between Pterostilbene and Quercetin Inhibits Metastatic Activity of B16 Melanoma. *Neoplasia.* 2005;7(1):37-47. doi:10.1593/neo.04337
215. Asensi M, Medina I, Ortega A, et al. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(3):387-398. doi:10.1016/S0891-5849(02)00911-5
216. Estrela JM, Ortega A, Mena S, Rodriguez ML, Asensi M. Pterostilbene: Biomedical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013;50(3):65-78. doi:10.3109/10408363.2013.805182
217. Chang J, Rimando A, Pallas M, et al. Low-dose pterostilbene, but not resveratrol, is a potent neuromodulator in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2012;33(9):2062-2071. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.015
218. Ruiz MJ, Fernández M, Picó Y, et al. Dietary Administration of High Doses of Pterostilbene and Quercetin to Mice Is Not Toxic. *J Agric Food Chem.* 2009;57(8):3180-3186. doi:10.1021/jf803579e
219. Riche DM, Riche KD, Blackshear CT, et al. Pterostilbene on Metabolic Parameters: A Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Trial. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2014;2014:1-8. doi:10.1155/2014/459165
220. Frederick DW, Loro E, Liu L, et al. Loss of NAD Homeostasis Leads to Progressive and Reversible Degeneration of Skeletal Muscle. *Cell Metab.* 2016;24(2):269-282. doi:10.1016/j.cmet.2016.07.005
221. Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, et al. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *J Neurol Sci.* 1999;169(1-2):13-21. doi:10.1016/S0022-510X(99)00210-5
222. World Medical Association Declaration of Helsinki. *JAMA.* 2013;310(20):2191. doi:10.1001/jama.2013.281053
223. Couratier P, Torny F, Lacoste M. Échelles fonctionnelles de la sclérose latérale amyotrophique. *Rev Neurol (Paris).* 2006;162(4):502-507. doi:10.1016/S0035-3787(06)75041-X
224. Campos TS, Rodríguez-Santos F, Esteban J, Vázquez PC, Mora Pardina JS, Carmona AC. Spanish adaptation of the revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS-R). *Amyotroph Lateral Scler.* 2010;11(5):475-477. doi:10.3109/17482968.2010.489115
225. Mirallas Martínez JA, Real Collado MC. ¿Índice de Barthel o Medida de Independencia Funcional? *Rehabilitación.* 2003;37(3):152-157. doi:10.1016/S0048-7120(03)73359-3
226. Cid-Ruzafa J D-MJ. Valoración de la discapacidad física: el índice de Barthel. *Rev Española Salud Pública.* 1997;71(2):127-137.
227. MAHONEY FI, BARTHEL DW. FUNCTIONAL EVALUATION: THE BARTHEL INDEX. *Md State Med J.* 1965;14:61-65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14258950>.

228. Nève V, Hulo S, Edmé J-L, et al. Utility of measuring FEV 0.75 /FVC ratio in preschoolers with uncontrolled wheezing disorder. *Eur Respir J*. 2016;48(2):420-427. doi:10.1183/13993003.01391-2015
229. Paternostro-Sluga T, Grim-Stieger M, Posch M, et al. Reliability and validity of the Medical Research Council (MRC) scale and a modified scale for testing muscle strength in patients with radial palsy. *J Rehabil Med*. 2008;40(8):665-671. doi:10.2340/16501977-0235
230. De Wel B, Goosens V, Sobota A, et al. Nusinersen treatment significantly improves hand grip strength, hand motor function and MRC sum scores in adult patients with spinal muscular atrophy types 3 and 4. *J Neurol*. 2021;268(3):923-935. doi:10.1007/s00415-020-10223-9
231. Marfell-Jones, M., Olds, T., Stewart, A. y Carter L. *International Standards for Anthropometric Assessment*. Potchefstroom, South Africa: The International Society for the Advancement of Kin Anthropometric (ISAK); 2006.
232. Faulkner JA. *Physiology of Swimming and Diving*. (Falls H, ed.). Baltimore: Human Exercise Physiology; 1968.
233. WANG J, THORNTON JC, KOLESNIK S, PIERSON RN. Anthropometry in Body Composition: An Overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;904(1):317-326. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06474.x
234. Kollwe K, Mauss U, Krampfl K, Petri S, Dengler R, Mohammadi B. ALSFRS-R score and its ratio: A useful predictor for ALS-progression. *J Neurol Sci*. 2008;275(1-2):69-73. doi:10.1016/j.jns.2008.07.016
235. Moore GF, Audrey S, Barker M, et al. Process evaluation of complex interventions: Medical Research Council guidance. *BMJ*. 2015;350(mar19 6):h1258-h1258. doi:10.1136/bmj.h1258
236. Chin K-Y, Ima-Nirwana S. Calcaneal Quantitative Ultrasound as a Determinant of Bone Health Status: What Properties of Bone Does It Reflect? *Int J Med Sci*. 2013;10(12):1778-1783. doi:10.7150/ijms.6765
237. Trimou P, Bosaeus I, Bengtsson B-Å, Landin-Wilhelmsen K. High correlation between quantitative ultrasound and DXA during 7 years of follow-up. *Eur J Radiol*. 2010;73(2):360-364. doi:10.1016/j.ejrad.2008.11.024
238. Xu Y, Guo B, Gong J, Xu H, Bai Z. The correlation between calcaneus stiffness index calculated by QUS and total body BMD assessed by DXA in Chinese children and adolescents. *J Bone Miner Metab*. 2014;32(2):159-166. doi:10.1007/s00774-013-0474-5
239. Damilakis J, Perisinakis K, Gourtsoyiannis N. Imaging Ultrasonometry of the Calcaneus: Optimum T-Score Thresholds for the Identification of Osteoporotic Subjects. *Calcif Tissue Int*. 2001;68(4):219-224. doi:10.1007/s002230020014
240. Frost ML, Blake GM, Fogelman I. Can the WHO Criteria for Diagnosing Osteoporosis be Applied to Calcaneal Quantitative Ultrasound? *Osteoporos Int*. 2000;11(4):321-330. doi:10.1007/s001980070121
241. Awamleh García P, Alonso Martín JJ, Jiménez Hernández RM, et al. Hallazgos electrocardiográficos anormales en la población mayor de 40 años. Prevalencia y significación clínica. Resultados del estudio OFRECE. *Rev Española Cardiol*. 2019;72(10):820-826. doi:10.1016/j.recesp.2018.10.005
242. Cobos Gil MA, García Rubira JC. ¿Quién fue el autor de la fórmula de Bazett? *Rev Española Cardiol*. 2008;61(8):896-897. doi:10.1157/13125006
243. G L-T. Métodos para determinar el eje eléctrico en un electrocardiograma. *Rev Mex Cardiol*. 2016;27(1):s35-s40.
244. Robert B. Northrop. *Non-Invasive Instrumentation and Measurement in Medical Diagnosis, Second Edition*. 2nd ed. (CRC Press., ed.). CRC Press; 2017. doi:10.1201/9781315117690
245. Campanini I, Merlo A, Degola P, Merletti R, Vezzosi G, Farina D. Effect of electrode location on EMG signal envelope in leg muscles during gait. *J Electromyogr Kinesiol*. 2007;17(4):515-526. doi:10.1016/j.jelekin.2006.06.001

246. Farina D, Merletti R, Enoka RM. The extraction of neural strategies from the surface EMG: an update. *J Appl Physiol*. 2014;117(11):1215-1230. doi:10.1152/jappphysiol.00162.2014
247. Fuglevand AJ, Winter DA, Patla AE. Models of recruitment and rate coding organization in motor-unit pools. *J Neurophysiol*. 1993;70(6):2470-2488. doi:10.1152/jn.1993.70.6.2470
248. Mesin L, Joubert M, Hanekom T, Merletti R, Farina D. A Finite Element Model for Describing the Effect of Muscle Shortening on Surface EMG. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2006;53(4):593-600. doi:10.1109/TBME.2006.870256
249. Milutinovic L. Uso de la dinamometría isométrica computerizada y electromiografías superficiales cuantitativa en la valoración del síndrome del latigazo cervical. 2001.
250. Hermens HJ FB. SENIAM. <http://www.seniam.org>. Published 2006.
251. Merlo A, Campanini I. Technical Aspects of Surface Electromyography for Clinicians. *Open Rehabil J*. 2010;3(1):98-109. doi:10.2174/1874943701003010098
252. Roland KP, Jones GR, Jakobi JM. Parkinson's disease and sex-related differences in electromyography during daily life. *J Electromyogr Kinesiol*. 2013;23(4):958-965. doi:10.1016/j.jelekin.2013.03.008
253. Kian-Bostanabad S, Azghani M-R. The relationship between RMS electromyography and thickness change in the skeletal muscles. *Med Eng Phys*. 2017;43:92-96. doi:10.1016/j.medengphy.2017.01.020
254. Ko FC, Li J, Brooks DJ, Rutkove SB, Bouxsein ML. Structural and functional properties of bone are compromised in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2018;19(5-6):457-462. doi:10.1080/21678421.2018.1452946
255. Almeida CS, Stanich P, Salvioni CCS, Diccini S. Assessment and nutrition education in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2016;74(11):902-908. doi:10.1590/0004-282x20160145
256. Lisle S, Tennison M. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Sports Med Rep*. 2015;14(1):45-46. doi:10.1249/JSR.0000000000000122
257. Cruz DC, Nelson LM, McGuire V, Longstreth Jr. WT. Physical Trauma and Family History of Neurodegenerative Diseases in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Population-Based Case-Control Study. *Neuroepidemiology*. 1999;18(2):101-110. doi:10.1159/000069413
258. Pupillo E, Messina P, Logroscino G, et al. Trauma and amyotrophic lateral sclerosis: a case-control study from a population-based registry. *Eur J Neurol*. 2012;19(12):1509-1517. doi:10.1111/j.1468-1331.2012.03723.x
259. Seals RM, Hansen J, Gredal O, Weisskopf MG. Physical Trauma and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Population-Based Study Using Danish National Registries. *Am J Epidemiol*. 2016;183(4):294-301. doi:10.1093/aje/kwv169
260. Sato Y, Honda Y, Asoh T, Kikuyama M, Oizumi K. Hypovitaminosis D and Decreased Bone Mineral Density in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Eur Neurol*. 1997;37(4):225-229. doi:10.1159/000117447
261. Karam C, Barrett MJ, Imperato T, MacGowan DJL, Scelsa S. Vitamin D deficiency and its supplementation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2013;20(11):1550-1553. doi:10.1016/j.jocn.2013.01.011
262. Roos PM. Osteoporosis in neurodegeneration. *J Trace Elem Med Biol*. 2014;28(4):418-421. doi:10.1016/j.jtemb.2014.08.010
263. Hamrick M. JMNI special issue: basic science and mechanisms of muscle-bone interactions. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2010;10(1):1-2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190374>.
264. Kaji H. Interaction between Muscle and Bone. *J Bone Metab*. 2014;21(1):29. doi:10.11005/jbm.2014.21.1.29

265. Lang TF. The Bone-Muscle Relationship in Men and Women. *J Osteoporos.* 2011;2011:1-4. doi:10.4061/2011/702735
266. LeBrasseur NK, Achenbach SJ, Melton LJ, Amin S, Khosla S. Skeletal muscle mass is associated with bone geometry and microstructure and serum insulin-like growth factor binding protein-2 levels in adult women and men. *J Bone Miner Res.* 2012;27(10):2159-2169. doi:10.1002/jbmr.1666
267. Shackelford LC, LeBlanc AD, Driscoll TB, et al. Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss. *J Appl Physiol.* 2004;97(1):119-129. doi:10.1152/jappphysiol.00741.2003
268. Kahn J, Shwartz Y, Blitz E, et al. Muscle Contraction Is Necessary to Maintain Joint Progenitor Cell Fate. *Dev Cell.* 2009;16(5):734-743. doi:10.1016/j.devcel.2009.04.013
269. Shwartz Y, Farkas Z, Stern T, Aszodi A, Zelzer E. Muscle contraction controls skeletal morphogenesis through regulation of chondrocyte convergent extension. *Dev Biol.* 2012;370(1):154-163. doi:10.1016/j.ydbio.2012.07.026
270. Li H, Johnson NR, Usas A, et al. Sustained Release of Bone Morphogenetic Protein 2 via Coacervate Improves the Osteogenic Potential of Muscle-Derived Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(9):667-677. doi:10.5966/sctm.2013-0027
271. Oishi T, Uezumi A, Kanaji A, et al. Osteogenic Differentiation Capacity of Human Skeletal Muscle-Derived Progenitor Cells. Asakura A, ed. *PLoS One.* 2013;8(2):e56641. doi:10.1371/journal.pone.0056641
272. Sun J-S, Wu SY-H, Lin F-H. The role of muscle-derived stem cells in bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26(18):3953-3960. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.016
273. Bikle DD, Halloran BP, Morey-Holton E. Impact of skeletal unloading on bone formation: Role of systemic and local factors. *Acta Astronaut.* 1994;33:119-129. doi:10.1016/0094-5765(94)90116-3
274. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, et al. Mechanical Stimulation of Bone in Vivo Reduces Osteocyte Expression of Sost/Sclerostin. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5866-5875. doi:10.1074/jbc.M705092200
275. Sato Y, Honda Y, Iwamoto J. RETRACTED: Etidronate for fracture prevention in amyotrophic lateral sclerosis: A randomized controlled trial. *Bone.* 2018;106:214. doi:10.1016/j.bone.2017.10.008
276. Fang F, Kwee LC, Allen KD, et al. Association Between Blood Lead and the Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Am J Epidemiol.* 2010;171(10):1126-1133. doi:10.1093/aje/kwq063
277. Grondin J, Grimal Q, Yamamoto K, Matsukawa M, Saïed A, Laugier P. Relative contributions of porosity and mineralized matrix properties to the bulk axial ultrasonic wave velocity in human cortical bone. *Ultrasonics.* 2012;52(4):467-471. doi:10.1016/j.ultras.2011.11.008
278. Khaw K-T, Reeve J, Luben R, et al. Prediction of total and hip fracture risk in men and women by quantitative ultrasound of the calcaneus: EPIC-Norfolk prospective population study. *Lancet.* 2004;363(9404):197-202. doi:10.1016/S0140-6736(03)15325-1
279. Rodriguez-Castro CE, Elfar A, Gonzalez-Ibarra FP, Siddiqui T, Abbas A. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Pseudo-infarct Pattern on the Electrocardiogram. *Am J Med.* 2013;126(7):e3-e5. doi:10.1016/j.amjmed.2013.01.023
280. Malik M, Hnatkova K, Kowalski D, Keirns JJ, van Gelderen EM. QT/RR curvatures in healthy subjects: sex differences and covariates. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2013;305(12):H1798-H1806. doi:10.1152/ajpheart.00577.2013
281. Abi-Gerges N, Philp K, Pollard C, Wakefield I, Hammond TG, Valentin J-P. Sex differences in ventricular repolarization: from cardiac electrophysiology to Torsades de Pointes. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004;18(2):139-151. doi:10.1111/j.1472-8206.2004.00230.x

282. Couderc J, Xia X, Denjoy I, et al. Genotype- and Sex-Specific QT-RR Relationship in the Type-1 Long-QT Syndrome. *J Am Heart Assoc.* 2012;1(2). doi:10.1161/JAHA.112.000570
283. Asenjo G R. Intervalo QT prolongado: un factor de riesgo de muerte súbita frecuentemente olvidado. *Rev Chil Cardiol.* 2009;28(4). doi:10.4067/S0718-85602009000300011
284. Baumert M, Porta A, Vos MA, et al. QT interval variability in body surface ECG: measurement, physiological basis, and clinical value: position statement and consensus guidance endorsed by the European Heart Rhythm Association jointly with the ESC Working Group on Cardiac Cellular Electroph. *Europace.* 2016;18(6):925-944. doi:10.1093/europace/euv405
285. Park JK, Shin JH, Kim SH, et al. A Comparison of Cornell and Sokolow-Lyon Electrocardiographic Criteria for Left Ventricular Hypertrophy in Korean Patients. *Korean Circ J.* 2012;42(9):606. doi:10.4070/kcj.2012.42.9.606
286. Pimentel RMM, Macedo H, Valenti VE, et al. Decreased Heart Rate Variability in Individuals With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Respir Care.* 2019;64(9):1088-1095. doi:10.4187/respcare.06681
287. De Maria B, Bari V, Marchi A, et al. Cardiovascular control indexes in amyotrophic lateral sclerosis patients and their relation with clinical markers. In: *2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*. IEEE; 2015:2055-2058. doi:10.1109/EMBC.2015.7318791
288. Cudkowicz ME, Titus S, Kearney M, et al. Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2014;13(11):1083-1091. doi:10.1016/S1474-4422(14)70222-4
289. Abe K, Aoki M, Tsuji S, et al. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2017;16(7):505-512. doi:10.1016/S1474-4422(17)30115-1
290. Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev.* 2013;27(19):2072-2085. doi:10.1101/gad.227439.113
291. Bai P, Cantó C. The Role of PARP-1 and PARP-2 Enzymes in Metabolic Regulation and Disease. *Cell Metab.* 2012;16(3):290-295. doi:10.1016/j.cmet.2012.06.016
292. Fang EF, Kassahun H, Croteau DL, et al. NAD + Replenishment Improves Lifespan and Healthspan in Ataxia Telangiectasia Models via Mitophagy and DNA Repair. *Cell Metab.* 2016;24(4):566-581. doi:10.1016/j.cmet.2016.09.004
293. Cheng Y, Di S, Fan C, et al. SIRT1 activation by pterostilbene attenuates the skeletal muscle oxidative stress injury and mitochondrial dysfunction induced by ischemia reperfusion injury. *Apoptosis.* 2016;21(8):905-916. doi:10.1007/s10495-016-1258-x
294. Azzolini M, La Spina M, Mattarei A, Paradisi C, Zoratti M, Biasutto L. Pharmacokinetics and tissue distribution of pterostilbene in the rat. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(11):2122-2132. doi:10.1002/mnfr.201400244
295. Benlloch M, Obrador E, Valles SL, et al. Pterostilbene Decreases the Antioxidant Defenses of Aggressive Cancer Cells In Vivo : A Physiological Glucocorticoids- and Nrf2-Dependent Mechanism. *Antioxid Redox Signal.* 2016;24(17):974-990. doi:10.1089/ars.2015.6437
296. Satoh T, McKercher SR, Lipton SA. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:645-657. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.022
297. Wilkins HM, Kirchhof D, Manning E, Joseph JW, Linseman DA. Mitochondrial Glutathione Transport Is a Key Determinant of Neuronal Susceptibility to Oxidative and Nitrosative Stress. *J Biol Chem.* 2013;288(7):5091-5101. doi:10.1074/jbc.M112.405738



8

**Anexos.**



## 8 Anexos

### Anexo 1: Informe del comité de investigación y ética de la Universitat de València.

VNIVERSITAT  
 ID VALÈNCIA Vicerektorat  
 d'Investigació i Política Científica

**D. José María Montiel Company**, Profesor Contratado Doctor Interino del departamento de Estomatología, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 12 de diciembre de 2016, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

*“Impaacto de la intervención nutricional con ácidos grasos y antioxidantes en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)”*, número de procedimiento H1479983999044,

cuyo responsable es D. José M<sup>a</sup> Estrela Arigüel, ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a catorce de diciembre de dos mil dieciséis.



Anexo 2: Consentimiento informado.

Información y consentimiento paciente 2016

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO  
Y COMPROMISO DE CONFIDENCIALIDAD**

1.- INFORMACIÓN AL SUJETO DE EXPERIMENTACIÓN.

*El proyecto de investigación para el cual le pedimos su participación se titula: "Impacto de la intervención nutricional con ácidos grasos y antioxidantes en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)".*

Para que usted pueda participar en este estudio es necesario contar con su consentimiento, y que conozca la información básica necesaria para que dicho consentimiento pueda considerarse verdaderamente informado. Por ello, le ruego que lea detenidamente la siguiente información. Si tuviera alguna duda exprese la, antes de firmar este documento, al investigador principal del proyecto, bien personalmente, bien a través del teléfono o por correo electrónico. Los datos del investigador principal del proyecto aparecen también en el presente documento.

La información básica que debe conocer es la siguiente:

a) *Objetivo del estudio:* estudiar si la incorporación a su dieta de suplementos de ácidos grasos y antioxidantes mejora sus capacidades cognitivas y/o motoras valoradas mediante tests clínicos específicos.

b) *Metodología a utilizar para el estudio, tipo de colaboración que se espera de usted y duración de dicha colaboración:* Se trata de un estudio prospectivo, longitudinal, mixto, analítico y experimental a través de un ensayo clínico, para el que se requiere de una población de 48 enfermos de ELA, distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos de 12 pacientes cada uno. A los cuales se les aplicará, en función del grupo al que se le asigne, distintas intervenciones consistentes en la administración de ácidos grasos saturados en forma de aceite de coco y/o los antioxidantes pterostilbeno y nicotinamida ribósido (grupos 1º-3º). El 4º grupo será el control.

Se espera que usted colabore gratuitamente si acepta participar en el estudio, siguiendo de un modo riguroso y estricto la dieta que se le asignará por el equipo investigador.

La duración de este estudio es de 3 meses.

c) *Procedimientos preventivos, diagnósticos y/o terapéuticos disponibles alternativos a los que se investigan con este estudio:* (Se rellenará este apartado si procede por el tipo de estudio a realizar)

d) *Posibles molestias y riesgos de su participación en el estudio:* En cuanto a las molestias, los participantes deberán someterse antes de comenzar el estudio y una vez al mes (cuatro veces en total a lo largo del estudio) a diferentes pruebas motoras, cognitivas y conductuales, basadas en la aplicación de test y escalas, así como de electromiografías.

En cuanto a los riesgos para su salud, en función de los informes y estudios toxicológicos publicados en relación a los nutrientes administrados, todos los

### Información y consentimiento paciente 2016

suplementos nutricionales especificados previamente son naturales y carecen de toxicidad demostrada a las dosis de administración propuestas en este estudio.

(Indíquense especialmente los riesgos para la salud, destacando los graves, aunque sean poco frecuentes; los menos graves, cuando sean frecuentes; y los riesgos personalizados).

e) *Medidas para responder a los acontecimientos adversos:* (En el caso de que se produzca algún acontecimiento adverso en los sujetos que participen en la investigación, expliquen cómo se responderá).

f) *Medidas para asegurar una compensación adecuada en el caso de que usted sufra algún daño.*

g) *Beneficios que se espera obtener con la investigación:* Mejora en las funciones cognitivas y/o motoras.

h) *Consecuencias de la no participación:* El hecho de la no participación por su parte, no afectará a la relación con las personas que le propusieron participar, que será igual de cordial y dedicada con los que rechacen participar que con los que sí participen

i) *Posibilidad de retirada en cualquier momento y consecuencias:* Usted puede retirarse del proyecto en cualquier momento firmando la revocación del consentimiento que se incluye al final del documento. Su retirada no tendrá ninguna consecuencia negativa para usted, y será aceptada sin problemas por el equipo investigador. Puede ejercer los derechos de rectificación, cancelación y oposición a través de la dirección de correo electrónico indicada (joseenrique.delarubi@ucv.es), y podremos facilitarle el ejercicio de sus derechos.

j) *¿Quién ha financiado el estudio?:*  
Las instituciones encargadas de suministrar los diferentes nutrientes han sido por un lado la Fundación José Navarro, y por otro la empresa Elysium Health.

k) *¿Qué institución lo realiza?:* Se realiza en la Universitat de Valencia.

l) *Gratuidad por la participación:* Los sujetos de experimentación no obtendrán ninguna compensación económica por la participación en este estudio

m) *Previsión de uso posterior de los resultados:* Los resultados obtenidos se utilizarán con fines de investigación en la mejora de la enfermedad, con posibilidad de publicación científica de los posibles avances constatados.

n) *Equipo investigador:* (Indique los nombres completos de los miembros del equipo investigador).

José María Estrela Arigüel (Univ. de Valencia)

José Enrique de la Rubia Ortí (Univ. Católica San Vte. Mártir)

María Benlloch García (Univ. Católica San Vte. Mártir)

Carlos Villarón 8Casales (Universidad Europea de Valencia)

## Información y consentimiento paciente 2016

Pilar García Pardo (Universidad Europea de Valencia)

Eraci Drehmer (Univ. Católica San Vte. Mártir)

Jordi Caplliure (Univ. Católica San Vte. Mártir)

o) *Datos de contacto del investigador principal para aclaraciones o consultas:*  
Dr. José M. Estrela (Facultad de Medicina y Odontología, Departamento de Fisiología, Universidad de Valencia, 15 Av. Blasco Ibáñez, 46010 Valencia; Telf.: 963604646; email: jose.m.estrela@uv.es)

p) El proyecto se realizará siguiendo los criterios éticos internacionales recogidos en la Declaración de Helsinki.

### 2.- COMPROMISO DE CONFIDENCIALIDAD.

a) *Medidas para asegurar el respeto a la vida privada y a la confidencialidad de los datos personales:* Se han adoptado las medidas oportunas para garantizar la completa confidencialidad de los datos personales de los sujetos de experimentación que participen en este estudio, de acuerdo con la Ley De Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD) 15/1999, de 13 de diciembre. (Si lo considera oportuno, puede detallar más esas medidas)

b) *Medidas para acceder a la información relevante para usted que surjan de la investigación o de los resultados totales:* Sepa que tiene derecho a acceder a la información generada sobre usted en el estudio. (Detalle, brevemente, las medidas tomadas para acceder a esa información).

c) *Medidas tomadas por tratarse de un estudio anonimizado:* (Inclúyase este párrafo si se trata de un estudio de este tipo: "Se ha establecido un sistema de anonimización efectivo que no permite la identificación posterior del sujeto. En ningún caso se juntarán los consentimientos otorgados, donde sí se identifica al sujeto, con los cuestionarios utilizados en el estudio. En el uso que se realice de los resultados del estudio, con fines de docencia, investigación y/o publicación, se respetará siempre la debida anonimización de los datos de carácter personal, de modo que los sujetos de la investigación no resultarán identificados o identificables").

### 3.- CONSENTIMIENTO.

En el caso de que el sujeto de experimentación sea mayor de edad:

Don/Doña \_\_\_\_\_,  
mayor de edad, titular del DNI: \_\_\_\_\_, por el presente documento manifiesto que:

En el caso de que el sujeto de experimentación sea menor de edad o incapaz de obrar:

Don/Doña \_\_\_\_\_,  
mayor de edad, titular del DNI: \_\_\_\_\_,

padre,  madre,  tutor legal

### Información y consentimiento paciente 2016

de \_\_\_\_\_,  
por el presente documento manifiesto que:

He sido informado/a de las características del Proyecto de Investigación titulado: "Impacto de la intervención nutricional con ácidos grasos y antioxidantes en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)".

He leído tanto el apartado 1 del presente documento titulado "información al sujeto de experimentación", como el apartado 2 titulado "compromiso de confidencialidad", y he podido formular las dudas que me han surgido al respecto. Considero que he entendido dicha información.

Estoy informado/a de la posibilidad de retirarme en cualquier momento del estudio.

En virtud de tales condiciones, consiento participar en este estudio.

Y en prueba de conformidad, firmo el presente documento en el lugar y fecha que se indican a continuación.

Valencia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

<i>Nombre y apellidos del / de la participante:</i>	<i>Nombre y apellidos del padre, madre o tutor (en el caso de menores o incapaces):</i>	<i>Nombre y apellidos del investigador principal:</i> Dr. José M. Estrela
Firma:	Firma:	Firma:

Si el sujeto del estudio es un adolescente capaz intelectual y emocionalmente de entre 12 y 16 años debe de ser oída su opinión y autorizar su participación en el estudio firmando también este consentimiento. Cuando se trate de menores no incapaces ni incapacitados, pero emancipados o con 16 años cumplidos, no cabe prestar el consentimiento por representación y será el propio sujeto del estudio quien firmará el consentimiento (Ley 41/2002).

#### REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Revoco el consentimiento prestado en fecha para participar en el proyecto titulado "Impacto de la intervención nutricional con ácidos grasos y antioxidantes en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)" y, para que así conste, firmo la presente revocación.

En Valencia, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

**Información y consentimiento paciente 2016**

<i>Nombre y apellidos del / de la participante:</i>	<i>Nombre y apellidos del padre, madre o tutor (en el caso de menores o incapaces):</i>	<i>Nombre y apellidos del investigador principal:</i> Dr. José M. Estrela
Firma:	Firma:	Firma:

Anexo 3. Escala de valoración de ELA ALSFR-R.

Escala funcional de la ELA revisada (ALSFRS-R)		
1. Lenguaje	4	Procesos del habla normales.
	3	Trastornos del habla detectables.
	2	Habla inteligible con repeticiones.
	1	Habla complementada con comunicación no verbal.
	0	Pérdida del habla útil.
2. Salivación	4	Normal.
	3	Aunque leve, definitivo exceso de saliva en la boca, puede haber sialorrea nocturna mínima.
	2	Exceso de saliva moderado, puede haber sialorrea mínima.
	1	Exceso marcado de saliva con algo de sialorrea.
	0	Sialorrea marcada, requiere pañuelo constantemente.
3. Deglución	4	Hábitos alimenticios normales.
	3	Problemas alimenticios tempranos, ahogamientos ocasionales.
	2	Requiere cambios en la consistencia de la dieta.
	1	Necesita alimentación a través de tubos suplementarios.
	0	NPO (Nil Per Os) Alimentación exclusivamente enteral o parenteral.
4. Escritura	4	Normal.
	3	Un poco lenta y torpe, todas las palabras son legibles.
	2	No todas las palabras son legibles.
	1	Capaz de sostener una pluma, pero no de escribir.
	0	Incapaz de sostener una pluma.
5a. Cortado de comida y uso de utensilios (pacientes con gastrostomía) sin	4	Normal.
	3	Algo lento y torpe, no necesita ayuda.
	2	Puede cortar la mayoría de las comidas, lento y torpe, requiere algo de ayuda.
	1	La comida requiere ser cortada por alguien más, aún puede alimentarse lentamente.
	0	Necesita ser alimentado.
5b. Cortado de comida y uso de utensilios (pacientes con gastrostomía) con	4	Normal.
	3	Torpe, puede manejar todos los utensilios.
	2	Requiere algo de ayuda con cierres y broches
	1	Aporta poca ayuda para el cuidador
	0	Incapaz de realizar ningún aspecto de la tarea.

6. Vestido e higiene	4	Normal.
	3	Capaz de autocuidado con eficiencia disminuida.
	2	Requiere ayuda intermitente o métodos sustitutos.
	1	Requiere ayuda de cuidador para autocuidado.
	0	Dependencia total.
7. Voltearse en la cama y ajustar las cobijas	4	Normal.
	3	Algo lento y torpe, no necesita ayuda.
	2	Puede voltearse solo o ajustar las sábanas con dificultad.
	1	Puede comenzar a voltearse sin terminar, no puede ajustar sábanas.
	0	Dependencia total.
8. Caminar	4	Normal.
	3	Dificultad temprana para la deambulaci3n.
	2	Puede caminar con ayuda.
	1	S3lo movimiento funcional no ambulatorio.
	0	No hay movimiento voluntario de piernas.
9. Subir escaleras	4	Normal.
	3	Lento.
	2	Moderadamente inestable o fatiga.
	1	Requiere ayuda.
	0	No puede.
10. Disnea	4	Ninguna.
	3	Ocurre cuando camina.
	2	Ocurre con uno o m3s: comer, bañarse y vestirse.
	1	Ocurre en descanso ya sea sentado o acostado.
	0	Dificultad significativa, se considera soporte mec3nico.
11. Ortopnea	4	Ninguna.
	3	Un poco de dificultad al dormir, disnea diurna, no siempre requiere de dos almohadas.
	2	Requiere de almohadas extra para dormir (>2)
	1	S3lo puede dormir sentado.
	0	Incapaz de dormir.
12. Insuficiencia respiratoria	4	Ninguna.
	3	Uso intermitente de BiPAP
	2	Uso continuo de BiPAP por las noches.
	1	Uso continuo de BiPAP d3a y noche.
	0	Ventilaci3n mec3nica invasiva por medio de intubaci3n/traqueostom3a.

Anexo 4. Índice Barthel.

Comer	- Totalmente independiente	10
	- Necesita ayuda para cortar carne, pan, etc	5
	- Dependiente	0
Lavarse	- Independiente. Entra y sale solo del baño	5
	- Dependiente	0
Vestirse	- Independiente. Capaz de ponerse y quitarse la ropa, abotonarse, atarse los zapatos	10
	- Necesita ayuda	5
	- Dependiente	0
Arreglarse	- Independiente para lavarse la cara, las manos, peinarse, afeitarse, maquillarse, etc	5
	- Dependiente	0
Deposiciones	- Contiente	10
	- Ocasionalmente algún episodio de incontinencia o necesita ayuda para administrarse supositorios o lavativas	5
	- Incontinente	0
Micción	- Contiente o es capaz de cuidarse la sonda	10
	- Ocasionalmente, máx un episodio de incontinencia en 24h,necesita ayuda para cuidar la sonda	5
	- Incontinente	0
Usar el retrete	- Independiente para ir al WC, quitarse y ponerse la ropa	10
	- Necesita ayuda para ir al WC, pero se limpia solo	5
	- Dependiente	0
Trasladarse	- Independiente para ir del sillón a la cama	15
	- Mínima ayuda física o supervisión	10
	- Gran ayuda pero es capaz de mantenerse sentado sin ayuda	5
	- Dependiente	0
Deambular	- Independiente, camina solo 50 metros	15
	- Necesita ayuda física o supervisión para caminar 50m	10
	- Independiente en silla de ruedas, sin ayuda	5
	- Dependiente	0
Escalones	- Independiente para subir y bajar escaleras	10
	- Necesita ayuda física o supervisión	5
	- Dependiente	0
TOTAL		

Valoración de la incapacidad funcional:

100 Total independencia (siendo 90 la máxima si el paciente usa silla de ruedas)

60 Dependencia leve

35-55 Dependencia moderada

20-35 Dependencia severa

20 Dependencia total

Anexo 5. Escala MRC.

---

**ESCALA DE FUERZA MUSCULAR MODIFICADA MRC (*Medical Research Council*)**

---

<b>0</b>	<b>AUSENTE</b>	Parálisis total
<b>1</b>	<b>MÍNIMA</b>	Contracción muscular visible sin movimiento
<b>2</b>	<b>ESCASA</b>	Movimiento, eliminada la gravedad
<b>3</b>	<b>REGULAR</b>	Movimiento parcial sólo contra gravedad
<b>3+</b>	<b>REGULAR +</b>	Movimiento completo sólo contra gravedad
<b>4-</b>	<b>BUENA -</b>	Movimiento completo contra gravedad y resistencia mínima
<b>4</b>	<b>BUENA</b>	Movimiento completo contra gravedad y resistencia moderada
<b>4+</b>	<b>BUENA +</b>	Movimiento completo contra gravedad y resistencia fuerte
<b>5</b>	<b>NORMAL</b>	Movimiento completo contra resistencia total

Paternostro-Sluga T, Grim-Stieger M, Posch M, Schuhfried O, Vacariu G, Mittermaier C, Bittner C, Fialka-Moser V. Reliability and validity of the Medical Research Council (MRC) scale and a modified scale for testing muscle strength in patients with radial palsy. *J Rehabil Med.* 2008 Aug;40(8):665-71

---

Anexo 6. Ejemplos de dietas utilizadas en el estudio.

*Ejemplo para sexo masculino.*

<b>3 INGESTA</b>	<b>LUNES</b>	<b>MARTES</b>	<b>MIÉRCOLES</b>	<b>JUEVES</b>	<b>VIERNES</b>	<b>SABADO</b>	<b>DOMINGO</b>
<b>DESAYUNO</b>	250 ml leche desnatada con 10 g chocolate polvo 40 g pan blanco 10 g nueces 20 g jamón cocido	150 g yogur desnatado 10 g avellanas 50 g muesli (o) avena 100 g pera	250 ml leche desnatada 10 g chocolate polvo 40 g pan blanco 40 g pechuga pavo 10 g nueces	Batido de frutas: con naranja, fresas, ½ plátano 40 gr de Pan Integral.	250 ml leche desnatada 10 g chocolate polvo 40 g pan blanco 70 g queso blanco desnatado	Zumo de Naranja 40 g pan blanco 10 g nueces 250 ml leche desnatada 10 g chocolate polvo 20 g de jamón cocido	250 ml leche desnatada 30 g pan blanco 20 g pechuga pavo 10 g nueces 100 g pera
<b>ALMUERZO</b>	01 pieza de Fruta 10 g nueces	40 g pan integral 40 g jamón cocido 100 g plátano	40 g atún enlatado 40 g pan blanco 200 g pera 10 g almendra	40 g pan integral Con tomate natura 20 g jamón serrano 10 g nueces	40 g pan blanco 01 cortada fina de queso fresco 100 g mandarina 10 g nueces	01 yogur (o) Kéfir 100 gr de frutos rojos 10 gr almendras	30 g pan integral 40 g jamón cocido 150 g plátano
<b>COMIDA</b>	Hervido: 200 g judía verde 100 g patata 150 g carne magra ternera 80 g pan blanco Con humus 30 ml aceite de coco 01 yogur	Ensalada lechuga, tomate, pepino, cebolla, atún. 180 g arroz blanco (cocido) 200 g pechuga de pollo 80 g pan blanco 30 ml aceite coco 150 g Manzana	Legumbres: 100 g patata 60 g lentejas 200 g zanahoria 3 g ajo 150 g tomate crudo 80 g pan blanco 20 g jamón serrano 30 ml aceite coco 300 g piña (o) Naranja	Ensalada de brotes verdes, tomate, zanahoria. 250 g macarrones (cocido) Salsa de tomate natural con cebolla y ajo 100 g carne magra ternera 30 ml aceite coco 200 gr Frutos rojos	Legumbres: alubias (o) garbanzos con tomate cebollita, ajo, 100 gr patata, espinaca 20 g jamón serrano y 01 huevo 80 g pan blanco Con humus 30 ml aceite coco 150 g mandarina	Sopa de Fideos: 01 porción Filete de pavo: 200 gr 80 gr de Pan con queso de untar 30 ml aceite coco 01 yogur	Ensalada de brotes verdes, tomate, cebolla, atún, remolacha Paella de carne (pollo y conejo) y verduras 80 g pan blanco 30 ml aceite coco 01 naranja

<b>MERIENDA</b>	125 g yogur desnatado 100 g cerezas	10 g avellanas Café con leche desnatada 30 g pan integral 01 loncha de pechuga de pavo	10 g almendras 100 g yogur desnatado 35 g cereales integrales 100 g hamburguesa	Batido de Frutas: zumo naranja, ½ frutos rojos, ½ plátano. 10 g nueces	Café con leche desnatada 60 g pan integral 20 g mermelada albaricoque 10 g mantequilla sin sal	Bol de Frutas con 10 gr de almendras	125 g yogur desnatado 20 g mermelada grosella 02 galletas Integral
<b>CENA</b>	200 g mero 100 g calabacín 100 g puerro 200 g calabaza 80 gr de Pan 30 ml aceite coco 150 g mandarina	Tortilla Verduras al vapor 150 g alcachofa 150 g judía verde 80 g Pan 30 ml aceite coco 01 yogur con nueces	200 g salmón 100 g espinacas 100 g coles Bruselas 80 gr de Pan 30 ml aceite coco 01 fruta	Ensalada canónicos, rúcula, tomate, rabanitos, atún Guisantes salteados 45 g jamón cocido Clara de huevo 30 ml aceite coco 125 yogur desnatado	120 g Hamburguesa de ternera 100 g pan blanco Ensalada de tomate, lechuga y pepino 30 ml aceite coco 01 fruta	120 g merluza 60 g pan blanco 150 g patata 150 g judías verdes 30 ml aceite coco 01 yogur	Ensalada lechuga, tomate, maíz, ½ aguacate, nueces Filete de pollo (o) Pavo: 200 gr 30 ml aceite coco Manzana asada
<b>LÍQUIDOS</b>	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros

Ejemplo para sexo femenino.

3 INGESTA	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO	DOMINGO
<b>DESAYUNO</b>	Zumo de Naranja 40 g pan tostado con tomate natural 02 lonchas finas de jamón cocido 10 g almendra en polvo	150 g yogur desnatado 10 g avellanas 50 g muesli (o) avena 100 g pera y fresa	Zumo de Frutos rojos 250 ml leche desnatada 100 g de Biscocho Casero 10 g nueces molida	Batido de frutas: con naranja, fresas, ½ plátano 40 gr de Pan Integral. 02 lonchas de jamón York	250 ml Leche desnatada 40 g pan blanco 01 cortada de queso blanco (o) de untar Biscocho casero (o) 01 Pera	Zumo de Naranja 40 g pan blanco Con 02 lonchas de jamón cocido 10 g nueces	Batido de Frutas: con naranja, arándanos, ½ plátano 40 g pan integral con tomate natural 20 g pechuga pavo
<b>ALMUERZO</b>	01 pieza de Fruta	01 plátano (o) 01 Actimel	200 g pera	30 g pan integral Con tomate natural 20 g jamón serrano	30 g pan blanco 01 cortada fina de queso fresco	01 yogur (o) Kéfir 100 gr de frutos rojos	30 g pan integral 40 g jamón cocido INFUSION
<b>COMIDA</b>	Guisado de ternera con judía verde 100 g patata, tomate y cebolla 80 g pan blanco 30 ml aceite de coco 01 pieza de Fruta	Ensalada lechuga, tomate, pepino, cebolla, atún. 180 g arroz blanco (cocido) 200 g pechuga de pollo 30 ml aceite coco 01 pieza de Fruta	Legumbres: 100 g patata 60 g lentejas 200 g zanahoria 3 g ajo 150 g tomate crudo 200 gr de Pescado 30 ml aceite coco 300 g piña (o) Naranja	Ensalada de brotes verdes, tomate, zanahoria. Albóndigas con salsa de tomate y guisantes, zanahoria 30 ml aceite coco 200 gr Frutos rojos	Legumbres: alubias (o) garbanzos con tomate cebollita, ajo, 100 gr patata, espinaca 20 g jamón serrano y 01 huevo 80 g pan blanco Con humus 30 ml aceite coco 150 g mandarina	Sopa de Fideos: 01 porción Filete de pavo: 200 gr 80 gr de Pan con queso de untar 30 ml aceite coco 01 yogur	Ensalada de brotes verdes, tomate, cebolla, atún, remolacha Paella de carne (pollo y conejo) y verduras 80 g pan blanco 30 ml aceite coco 01 naranja

<b>MERIENDA</b>	125 g yogur desnatado 100 g cerezas	INFUSION 02 tortitas de arroz 01 loncha de pechuga de pavo	01 vaso de Leche 100 gr de Biscocho casero	Batido de Frutas: zumo naranja, frutos rojos, ½ plátano.	INFUSION 40 g pan integral 20 g mermelada albaricoque 10 g mantequilla sin sal	Bol de Frutas con 01 yogur	Calabaza (o) Manzana asada
<b>CENA</b>	150 g mero 100 g calabacín 100 g puerro 200 g calabaza 30 gr de Pan 30 ml aceite coco  150 g mandarina	Tortilla Verduras al vapor 150 g alcachofa 150 g judía verde 30 g Pan 30 ml aceite coco  01 yogur con semillas de lino	150 g salmón Sopa de Verduras 30 ml aceite coco  01 yogur con almendras en polvo	Ensalada tomate con queso fresco Guisantes salteados 45 g jamón cocido Clara de huevo 30 ml aceite coco  01 fruta (o) Yogur	120 g Hamburguesa de ternera 80 g pan Integral (THIN) Ensalada de tomate, lechuga y pepino 30 ml aceite coco  01 fruta	150 g merluza Verdura al Vapor: 100 g patata 100 g judías verdes y brócoli 30 ml aceite coco  01 yogur	Ensalada lechuga, tomate, maíz, ½ aguacate, nueces Filete de pollo (o) Pavo: 150 gr 30 ml aceite coco  Manzana asada
<b>LÍQUIDOS</b>	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros	1,5 a 2,0 litros



9

**Publicaciones.**



## 9 Publicaciones en revistas internacionales.



### 9.1 Publicación 1.

Received: 24 August 2019 | Revised: 7 October 2019 | Accepted: 17 October 2019  
DOI: 10.1002/fsn3.1324

REVIEW

Food Science & Nutrition Crossmark WILEY

### Therapeutic alternative of the ketogenic Mediterranean diet to improve mitochondrial activity in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): A Comprehensive Review

Jordi Caplliure-Llopis<sup>1,2</sup> | Thalía Peralta-Chamba<sup>3</sup> | Sandra Carrera-Julía<sup>1,4</sup> |  
María Cuerda-Ballester<sup>3</sup> | Eraci Drehmer-Rieger<sup>5</sup>  | María Mar López-Rodríguez<sup>6</sup>  |  
Jose Enrique de la Rubia Orti<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doctoral Degree's School, Catholic University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>2</sup>University Hospital la Ribera, Alzira, Spain

<sup>3</sup>Department of Nursing, Catholic University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>4</sup>Faculty of Medicine and Odontology, Catholic University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>5</sup>Department of Health and Functional Valorization, Catholic University of Valencia, Valencia, Spain

<sup>6</sup>Department of Nursing, University of Almería, Almería, Spain

\*Correspondence

Eraci Drehmer-Rieger, Department of Health and Functional Valorization, Catholic University of Valencia, Spain.  
Email: eraci.drehmer@ucv.es

#### Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable neurodegenerative disease which is pathogenically based on the mitochondrial alteration of motor neurons, causing progressive neuron death. While ALS is characterized by enormous oxidative stress, the Mediterranean diet has been seen to have high antioxidant power. Therefore, the aim of this study is to determine how the Mediterranean diet can improve mitochondrial activity, establishing the specific nutrients and, in addition, observing the pathogenic mechanisms related to the disease that would achieve this improvement. To this end, a comprehensive review of the literature was performed using PubMed. KBs have been observed to have a neuroprotective effect to improve energy balance, increasing survival and the number of motor neurons. This ketogenesis can be achieved after following a Mediterranean diet which is associated with great benefits in other neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and ALS. These benefits are due to the high antioxidant power especially based on polyphenols contained mainly in olive oil, wine, nuts, or berries. In short, KBs could be considered as a promising option to treat ALS, representing an alternative source to glucose in motor neurons by providing neuroprotection. In addition, treatment results can be improved as ketogenesis can be achieved (increase in KBs) by following a Mediterranean diet, thanks to the high antioxidant properties which, at the same time, would improve the high oxidative stress that characterizes the disease.

#### KEYWORDS

amyotrophic lateral sclerosis, ketone bodies, mediterranean diet, mitochondria

#### 1 | INTRODUCTION

Neurons are cells in charge of transmitting information through chemical and electrical signals, therefore requiring a high level of energy in

the brain. This use of energy represents between 20% and 25% of the total oxygen consumed by the body, of which approximately half is used to generate membrane potentials. At the same time, they maintain ion gradients for neurotransmission, the main source of said percentage

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Food Science & Nutrition* published by Wiley Periodicals, Inc.

*Food Sci Nutr.* 2019;00:1–13.

www.foodscience-nutrition.com | 1

(Wong et al., 1995). In this sense, in the event of needing extra energy derived from, for example, an increase in synaptic activity, there is no type of energy reserve that can be used in the brain (Karbowski, 2007).

The essential energy source for neurons, in the form of adenosine triphosphate (ATP), is obtained, on the one hand, from oxygen and, on the other hand, from glucose through catabolism performed in the Krebs cycle. Glucose is used by brain gray matter ten times more than the rest of the body, while there are variations in that consumption in different regions of the brain. This could explain that, in the case of an energetic alteration in the neurons, there is a great susceptibility to neurodegeneration and a great diversity of neurodegenerative diseases that can be triggered depending on the region where this altered glucose consumption takes place (Barros et al., 2013). In any case and whatever the disease may be, the basic explanation for this is glucose hypometabolism in the brain. It produces a structural and functional imbalance of the affected part of the brain, based on mitochondrial dysfunction which ends up influencing it overall. It can aggravate other existing alterations that are the real cause of disease such as Alzheimer's, Parkinson's (Paoli, Bianco, Damiani, & Bosco, 2014), or epilepsy (Jóźwiak, Kossoff, & Kotulska-Jóźwiak, 2011).

Regarding this pathological imbalance, the proposed therapeutic alternative is to provide an energy source that is not based on glucose, such as that represented by ketone bodies (KBs). A ketogenic diet is effective in patients with intractable epilepsy, myoclonic-astatic epilepsy (Doose syndrome) and also in Dravet syndrome (at an early stage) or phosphofructokinase deficiency and type V glycogenosis (McArdle's disease). Moreover, a ketogenic diet may be also effective in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's, and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), due to its neuroprotective action, which improves the mitochondrial function by rescuing the production of ATP (Barañano & Hartman, 2008).

## 2 | AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common motor neuron disease with an incidence of 1 in every 2,000 people (Gordon, 2013). Most cases are sporadic (sALS), and only 10% are familial (fALS) (Miller, Mitchell, Lyon, & Moore, 2003). This neurodegenerative disorder is characterized by the loss of motor neurons, both upper and lower, in the brain and spinal cord, which leads to paralysis of the voluntary muscles (Robberecht & Philips, 2013). This leads to a progressive motor dysfunction that results in alterations in the respiratory system (Polkey, Lyall, Moxham, & Leigh, 1999) until the death of the patient in a period of 2 to 5 years (Valko & Ciesla, 2019). Nowadays, there is no medical cure for this disease.

The pathogenic mechanisms of ALS that are currently accepted (Figure 1) are loss of oxidative control with an excessive generation of oxidative free radicals, accumulation of neurofilaments, and excitotoxicity linked to an increase in the neurotransmitter glutamate, producing a mitochondrial membrane dysfunction. This dysfunction

will eventually lead to an alteration in the energy balance related to a lower activity of the enzymes of the mitochondrial electron transport chain (ETC) in the spinal cord.

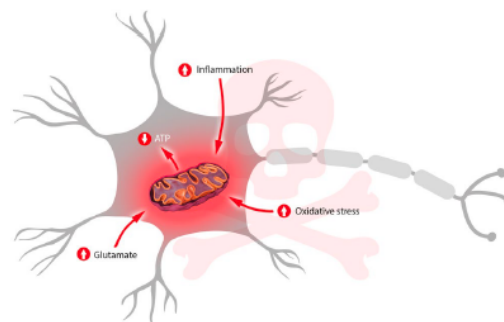
This is especially evident in the mutant forms of SOD1, which represent 20% of the cases of fALS. In these cases, a loss of mitochondrial membrane potential and mitochondrial inflammation are induced, with a decrease in the production of ATP, alteration of calcium homeostasis, and loss of the activity of the mitochondrial bioenergetic alteration (Carri et al., 1997; Ferri et al., 2006; Kruman, Pedersen, Springer, & Mattson, 1999).

Excessive oxidative stress is related to neuron death, not only as a primary factor but as a consequence of other mechanisms (Beal, Lang, & Ludolph, 2005), especially using reactive oxygen species (ROS), including superoxide, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl (OH) free radicals, and nitric oxide (NO).

This high level of oxidation has been directly and especially involved in the pathophysiology of fALS through SOD1 mutation. However, it is also linked to patients with sALS, where elevated levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) have been evidenced, which is a marker of oxidation of the motor cortex in patients with ALS (Ferrante et al., 2002).

The high level of oxidative stress of the two types of ALS can be explained by the high reactivity of ROS, especially with lipids, proteins, and DNA to induce cellular damage (Esposito et al., 2002; Halliwell, 2001; Singh, Sharad, & Kapur, 2004). In this sense, the large amount of lipids in the nervous tissue is worth mentioning (Singh et al., 2004), to which a high metabolic activity at a neuronal level should be also added, leading to a high ROS formation in these cells (Gurney et al., 1996).

On another note, glutamate is the primary excitatory neurotransmitter of the CNS that is necessary for neuronal synapse. However, an excess of this neurotransmitter on the synaptic cleft level due to failures in its uptake produces a prolonged opening of glutamate-dependent  $Ca^{++}$  channels in the neuron, generating a large number



**FIGURE 1** Diagram of the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) observed mainly after the genetic mutation in the SOD1 gene, and which causes the death of the motor neuron by damaging mitochondrial activity

of free radicals that end up damaging the mitochondrial structure (Doble, 1999; Shaw & Ince, 1997).

In addition, there is also a clear relation between mitochondrial dysfunction and motor neuron diseases. Morphological changes can be observed in mitochondria of SOD1 mice (Menziez, Ince, & Shaw, 2002) and in patients with sALS without mutations in SOD1 (Murata, Ohtsuka, & Terayama, 2008). At the same time, alterations in the ETC and mitochondrial DNA mutations in patients with ALS, related to the pathogenesis of the disease (Menziez et al., 2002), are also evidenced. Mitochondrial damage is related to an increase in intracellular  $Ca^{++}$  (Cassarino, Cassarino, Bennett, & Bennett, 1999) and alterations in the ETC (complexes I-IV) or coenzymes (Fosslien, 2001), eventually leading to an increase in ROS production and the activation of a caspase cascade that produces greater oxidative damage (Menziez et al., 2002).

All this suggests that an improvement of mitochondrial function may represent a therapeutic approach for ALS (Ari et al., 2014). In this sense, given the great results achieved when following a Mediterranean diet in other neurodegenerative diseases (that will be broadly addressed in this paper), following said diet could be an option to improve this function. Therefore, the aim of this study is to establish how the Mediterranean diet can improve mitochondrial activity, establishing the specific nutrients and, in addition, observing by means of which pathogenic mechanisms related to the disease would achieve this improvement.

Regarding altered energy balance, the first alternative to assess could be to increase or force the hydrocarbon pathway represented by glucose or fructose. However, it seems that this alternative is not the best one due to the existence of a metabolic alteration of cerebral glucose in patients with ALS (Pradat & Dib, 2009). This has been confirmed by analyzing 1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF, mainly with the purpose of certain metabolites in CSF, including KBs such as acetate or acetone (Blasco et al., 2010). In this sense, evidence confirms this alteration. It has been observed that patients with ALS are at risk of developing diabetes mellitus. This may be because of defects in the SOD1 gene, which are related to alterations in glucose metabolism, as seen in bacteria and yeast (Hamasaki et al., 2015), which lead to patients with diabetes to be more likely to develop the disease (Sun, Lu, Chen, Hou, & Li, 2015). At the same time, an early inhibition of the glycolytic capacity of muscle fibers in SOD1-G86R mice has been recently demonstrated, observing a progressive inhibition of phosphofructokinase 1 and an induction of the expression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (thereby strongly inactivating pyruvate dehydrogenase) (Palamiuc et al., 2015). In short, it can be said that these patients do not energetically relate well with calories from carbohydrates, which explains the fact that they only use 84% of the calories they need on a daily basis (Heffernan et al., 2004; Kasarskis, Berryman, Vanderleest, Schneider, & McClain, 1996). This results in an increased risk of developing the disease (Okamoto et al., 2007a) and of weight loss associated with the progression of the disease (Desport et al., 2000; Paganoni, Deng, Jaffa, Cudkowicz, & Wills, 2011). As a consequence, it is necessary to propose new sources of energy and, in this sense,

protein contribution does not seem to achieve an improvement in the survival and progression of the disease (Stanich, Chiapetta, Oliveria, & Gabbai, 2002). However, the fatty acid beta-oxidation pathway decreases the glucose needs that neurons have and also generates a higher yield in ATP. Therefore, the contribution of these acids in a diet is an alternative to the glycolytic pathway. In fact, it has been proven in mice that diets based on lipid calories decrease the risk of developing the disease (Morozova et al., 2008; Okamoto et al., 2007b) and the progression of it by 90% (Mattson, Cutler, & Camandola, 2007), especially when the origin of the fat is butter in 21% (Dupuis, Oudart, Rene, de Aguilar, & Loeffler, 2004), which is the main source of KBs, together with coconut oil.

### 3 | KETONE BODIES (KBs)

KBs are the molecules: acetoacetate, beta-hydroxybutyrate, and acetone. These molecules are involved in several metabolic pathways such as beta oxidation of fatty acids, gluconeogenesis, Krebs cycle, de novo lipogenesis, and sterol biosynthesis (Cahill, 2006; McGarry & Foster, 2003). They are mainly produced in the liver, originating in fatty acid beta oxidation, and mainly from acetyl-CoA. If there is an excess in acetyl-CoA, it can transform into acetoacetate and then finally beta-hydroxybutyric or directly transform into acetone (Newman & Verdin, 2014). They are then transferred to other tissues, such as brain, muscle, and heart, where the final oxidation is produced, creating energy and, therefore, representing a fuel source that is especially important for the brain (Achanta & Rae, 2017).

Ketone body production can occur in physiological situations such as pregnancy or in newborns (Puchalska & Crawford, 2017). Nonetheless, KBs are mainly produced as a result of fasting or low carbohydrate diets which, in turn, involve a lower source of energy, the main one being KBs (McGarry & Foster, 2003; Robinson & Williamson, 2017).

In this sense, due to the energy alternative that KBs represent on a mitochondrial level in neurons, KBs have important neuroprotective effects (Edmond, Robbins, Bergstrom, Cole, & de Vellis, 1987; Yang, He, & Schulz, 1987). This neuroprotection activity has been demonstrated in several neurological disorders, particularly in epilepsy (Stafstrom & Rho, 2012; Vining et al., 1998), in rodent models of Parkinson's disease (PD) (Cheng et al., 2009), in pain and inflammation (Ruskin, Kawamura, & Masino, 2009), and in juvenile traumatic brain injury (Deng-Bryant, Prins, Hovda, & Harris, 2011; Hu et al., 2009). It should be specified at this point that the contribution of KBs should not be the same for all diseases. For example, the administration of KBs required for epilepsy is high (reducing glucose metabolism and inhibiting the release of glutamate in neurons), while in Alzheimer's disease (AD) low doses of KB have a better therapeutic effect. In AD, this fact can be explained, on the one hand, because small doses are sufficient for energy supplementation (by providing a fraction of ATP that helps compensate the alteration of glucose metabolism). On the other hand, these low doses (specifically beta-hydroxybutyrate) have an impact on the improvement

of cognitive function due to both metabolic supplementation and the inhibition of glutamate release induced by A $\beta$  as a gliotransmitter, which most likely reduces hyperexcitability and inflammation (Hertz, Chen, & Waagepetersen, 2015). In addition, we should highlight that beta-hydroxybutyrate is particularly used as an intermediary between the energy metabolism, but it also regulates the cell functions, partly by directly activating the G protein-coupled receptor HCA1/GPR81, HCA2/GPR109A y HCA3/GPR109B (Ahmed, Tunaru, & Offermanns, 2009). These HCA receptors help to maintain homeostasis in changing metabolic and dietary conditions, by controlling metabolic, immune, and other bodily functions (Offermanns, 2017). The anti-inflammatory effects must be added to this neuroprotective capacity, and in this sense, recent studies show that the activation of the HCA2 receptor (which until now was known only to produce lipolysis) by beta-hydroxybutyrate mediates deep anti-inflammatory effects in a variety of tissues (Lukasova, Malaval, Gille, Kero, & Offermanns, 2011; Wanders, Graff, White, & Judd, 2013). This anti-inflammatory effect could be related to the inhibition of the release of proinflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and IL-18 observed thanks to beta-hydroxybutyrate (Goldberg et al., 2017; Youm et al., 2015). This indicates that HCA2 could be an important objective to treat inflammatory processes of diseases with based on a great level of inflammation (Graff, Fang, Wanders, & Judd, 2016).

In addition, they are also related to decreasing oxidative stress. High oxidative stress is associated with mitochondrial dysfunction and with the majority of neurodegenerative diseases (Islam, 2017). Yet, in this sense, KBs induce a reduction in free radicals (Veech, 2014) in relation to those produced when the main source of energy is glucose. Therefore, this involves a neuroprotection on a mitochondrial level (Greco, Glenn, Hovda, & Prins, 2016).

Finally, they could also be related to the metabolism of glutamate that is the main excitatory neurotransmitter in the CNS. KBs are able to decrease the levels of glutamate, to accelerate its transformation into GABA that, on the other hand, represents the main inhibitory neurotransmitter and appears as a neuroprotective agent (Yudkoff, Daikhin, Nissim, Lazarow, & Nissim, 2004).

#### 4 | KETONE BODIES (KBs) AND AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)

As for ALS, KBs have been used in animal models giving promising results (Table 1). In the first study published in 2006, it was observed that motor neurons were preserved by administering a ketogenic diet to transgenic mice (SOD1-G93A) through the administration of caprylic triglycerides (contributed by fractionated coconut oil), which was associated with an increased motor performance maintenance regarding control mice following an isocaloric diet. It was also observed that weight and synthesis of ATP at a mitochondrial level were increased (Zhao et al., 2006). Subsequently, this has been confirmed in another publication in which ketogenesis was produced in transgenic animal models, showing an improvement in motor functions associated with an increase in motor neurons (Ari et al., 2014;

Tefera et al., 2016; Zhao et al., 2012). Specifically, an increase in mitochondrial oxygen consumption both basal and maximum (which was correlated with an increase in KBs in the blood) and an increase in survival (they lived 6 days longer than the control mice) was observed (Zhao et al., 2012). Also, this survival increase was observed, associated with a delay in cognitive deterioration, after following the Deanna protocol based on the ketogenic diet (Ari et al., 2014). Finally, the administration of triheptanoin (triglyceride composed of 3 medium-chain fatty acids) protected lumbar motor neurons, which allowed a delay in the appearance of motor symptoms characteristic of the disease (Tefera et al., 2016). In order to explain these specific improvements of KBs in model animals of ALS, several authors propose specific activities related to the properties detailed in the previous section for these metabolites (Table 1).

On the one hand, there is glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase as endogenous antioxidants that counteract ROS damage to stop high oxidation. In this sense, KBs increase the antioxidant power of these endogenous antioxidants (Kong et al., 2017; Veech et al., 2017).

Regarding the excitability of glutamate evidenced in this disease, as already indicated, KBs decrease its levels. Thus, in adequate doses, the levels of glutamate in the synaptic cleft can be regulated, reducing hyperexcitability and inflammation, which would improve the course of the disease (Deng-Bryant et al., 2011) as observed in AD, where cognitive improvements are achieved in both animal (Mamelak, 2017) and human (Steele, Stuchbury, & Münch, 2007) models.

Regarding energy alterations as a consequence of mitochondrial malfunction in patients with ALS, KBs increase the correct mitochondrial activity and energy production problems, possibly due to their ability to restore the activity of complex I of the electron chain (whose function is reduced in ALS) as seen for this disease, both in *in vitro* studies with cell cultures (Tieu et al., 2003) and in animal models (Zhao et al., 2006). In this sense, we must outline the Krebs cycle which, alongside the electron transport chain, are the necessary sources of ATP in order for cells to function and survive, and this is altered in ALS (Niessen et al., 2007). On the other hand, sirtuins (SIRT3) have been linked to different studies about the disease, since sirtuins appear altered in SOD1-G93A-mouse models and patient tissues (Körner et al., 2013). *In vitro* SIRT3 protects against mitochondrial fragmentation and neuronal cell death induced by SOD1-G93A (Song, Song, Kincaid, Bossy, & Bossy-Wetzel, 2013) and, in this sense, primary motor neurons increase the expression of SIRT3 after treatment with medium-chain triglycerides (MCTs), the main source of KBs. Therefore, KBs can regulate mitochondrial activity and cell survival through the responses mediated by sirtuins (Körner et al., 2013). SIRT3 also regulates the production of KBs, which is confirmed by the increase in the expression of sirtuins in primary motor neuron cultures after treatment with MCTs, which can regulate mitochondrial activity and cell survival through the responses mediated by SIRT3.

In addition, making further emphasis on the enormous oxidative stress that characterizes ALS (Kruman et al., 1999), the contribution

**TABLE 1** Main improvements obtained on models of transgenic mice G93A-SOD1 of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), related in turn with the activities proposed for the KBs in other articles

Author, year	Intervention	Improvement	Proposed activity
Zhao et al., (2006)	Ketogenic diet	Preservation of motor neurons. Increase in weight and synthesis of ATP at the mitochondrial level.	Increase the antioxidant power of these endogenous antioxidants (Kong et al., 2017; Veech et al., 2017). Ability to restore the activity of complex I of the electron chain (Tieu et al., 2003; Zhao et al., 2006).
Zhao et al. (2012)	Caprylic triglyceride	Increase in motor neurons. Increase in mitochondrial oxygen consumption.	Regulation of sirtuin-mediated responses (Körner et al., 2013; Song et al., 2013).
Ari et al. (2014)	Deanna Protocol	Delay in cognitive deterioration. Improved motor function.	Reducing hyperexcitability and inflammation (Mamelak, 2017; Steele et al., 2007).
Tefera et al. (2016)	Triglyceride Triheptanoïn	Preservation of motor neurons. Survival increase.	Higher performance of Krebs cycle (Niessen et al., 2007).

of KBs (after liver metabolism) should originate from a diet with high antioxidant power.

## 5 | MEDITERRANEAN DIET

The most common version of the Mediterranean diet dates back to the 1990s and is based on plant foods, fresh fruit, olive oil, dairy products such as cheese or yogurt, fish, and poultry eaten in low to moderate amounts. It also includes the consumption of eggs (up to 4 weekly), small amounts of red meat and red wine in low to moderate amounts. The total fat in this diet represents 25%–35% of the daily intake of calories, of which 8% or less are saturated fats (Willett et al., 1995). Therefore, the Mediterranean diet is a highly varied diet mainly based on fish, olive oil, red wine, and vegetables (Alvarez-Sala Walther, Millán Núñez-Cortés, & de Oya Otero, 1996).

The Mediterranean diet could be a good source of KBs. In fact, the nutrients of a typical ketogenic diet are mainly nonstarchy vegetables, butter, eggs, olive oil, avocados, walnuts, and seeds (Taylor, Swerdlow, Burns, & Sullivan, 2019), many of which, such as olive oil, eggs, vegetables, and walnuts, are characteristic to the Mediterranean diet. These products, especially fish rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids, provide high amounts of KBs (Paoli et al., 2015). Moreover, this diet can further increase the production of KBs without being a typical ketogenic diet; enriching it with foods which contain large amounts of medium-chain triglycerides (MCTs) such as coconut oil (Pehowich, Gomes, & Barnes, 2000), goat's milk (Haenlein, 2004), or butter characteristic of the Mediterranean diet (Dupuis et al., 2004; Lahoz et al., 2018); and proportionally decreasing the percentage of carbohydrates (Paoli, Cenci, & Grimaldi, 2011). In this sense, this combination has been proposed as the "Spanish Ketogenic Mediterranean Diet," in which <30 g of carbohydrates per day is provided and, therefore, it fits under the definition of a ketogenic diet better (Pérez-Guisado, Muñoz-Serrano, & Alonso-Moraga, 2008). This would be in line with the Keto-Medit approach that combines the benefits of a ketogenic and Mediterranean diet (Perng, Chen, Perng, & Jambazian, 2017).

In addition, as well as being a promising vehicle for KBs, we must highlight the great antioxidant capacity that characterizes this diet. Oxidative stress is a direct consequence of the imbalance between the production of free radicals and the antioxidant capacity of our body and has been related to the development of various diseases, especially cardiovascular, carcinogenic, and neurodegenerative diseases. Among all the existing diets that can be followed, the Mediterranean diet is possibly the richest in antioxidants. Regarding its antioxidant properties, the Mediterranean diet contains, on the one hand, soluble or low molecular weight antioxidants such as vitamins C and E, phenolic compounds and carotenoids, and other macromolecular antioxidants that are polymeric phenolic compounds or polyphenols and carotenoids linked to macromolecules of plant foods, which contribute 61% to the antioxidant capacity of the diet (Hernández-Ruiz et al., 2018; Pérez-Jiménez, Díaz-Rubio, & Saura-Calixto, 2015). All these antioxidants, associated with the practice of physical activity, increase the total antioxidant capacity (Koloverou et al., 2016).

As for the specific nutrients in the diet that provide this antioxidant capacity, the activity attributed to virgin olive oil, one of its most outstanding foods, should be highlighted. The Mediterranean diet, when enriched with virgin olive oil, improves the atheroprotective functions of HDL in humans. This is due to the fact that the antioxidants in this food can help maintain Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), the enzyme responsible for cholesterol esterification, not oxidized and functional. In addition, there is also an increase in four key functions: cholesterol flow capacity, HDL-C metabolism, vasoprotective effects, and anti-inflammatory/antioxidant properties by a significant reduction in oxidative stress, which is not observed in low-fat diets (Hernández et al., 2017). Moreover, olive oil contains hydroxytyrosol (HT), a polyphenol that shows anticancer, anti-inflammatory, neuroprotective, and especially antioxidant properties (Hu, He, Jiang, & Xu, 2014; de Pablos, Espinosa-Oliva, Hornedo-Ortega, Cano, & Arguelles, 2019). At a hepatic level, the administration of tyrosol supplements in mice produces the attenuation of hepatic lipid peroxidation and the restoration of the redox balance of the antioxidant glutathione (Kalaiselvan, Samuthirapandi, Govindaraju, Sheeja Malar, & Kasi, 2016), and it also inhibits the oxidative stress

induced by palmitic acid in hepatocytes (Sarna et al., 2016). This evidence may be related to the activity of the total polyphenolic fraction (TPF) and to HT itself, which achieve a powerful in vitro free radical scavenging (improving the redox state by increasing glutathione levels (Kouka et al., 2017)). It may be also related to the protection against oxidative stress at a cellular level, achieved thanks to HT. This fact has been observed in *Caenorhabditis elegans* nematodes, when extra virgin olive oil is included in the Mediterranean diet (Rossi et al., 2017).

Another important component of the Mediterranean diet is wine, to which important antioxidant properties are attributed in the same way. Wine contains a wide variety of phenolic compounds such as quercetin, myricetin, catechins, tannins, anthocyanidins, resveratrol, and ferulic acid (Caruana, Cauchi, & Vassallo, 2016), which have been linked to preventing or delaying the progression of intestinal diseases characterized by oxidative stress and inflammation. It acts as a scavenger of free radicals and modulators of specific genes related to inflammation and involved in cellular redox signaling (Biasi et al., 2014; Colombo et al., 2019). In addition, neuroprotective effects have also been observed in neurodegenerative diseases, not only thanks to the antioxidant property, but also through a combined ability to antagonize amyloid aggregation, suppress neuroinflammation, modulate signaling pathways, and decrease mitochondrial dysfunction (Caruana et al., 2016).

Finally, grapes, nuts, and berries, common in Mediterranean diets, contain another polyphenol such as resveratrol that activates sirtuins, which could explain some of the beneficial effects of the diet (Rodríguez-Morató et al., 2016; Russo et al., 2014; Silva et al., 2019).

## 6 | THE ANTIOXIDANT EFFECT OF THE MEDITERRANEAN DIET IN NEURODEGENERATIVE DISEASES

This enormous antioxidant capacity has led to very good results in several diseases characterized by high levels of oxidative stress. Human beings who follow a Mediterranean diet have better parameters of anthropometric, metabolic, and inflammatory risk (Dinu, Pagliai, Casini, & Sofi, 2018). In this sense, neurodegenerative diseases, among which the aforementioned AD, PE, multiple sclerosis (MS), or ALS stand out and whose etiologies are partly unknown, have a clear metabolic and inflammatory components. Therefore, the possible early interventions that can be carried out in these diseases are mainly related to lifestyle habits, and here, diet plays a key role. In relation to the Mediterranean diet, a high adherence to this diet is associated with a low mortality and a lower risk of developing chronic diseases such as cancer, metabolic syndrome, depression, cardiovascular, and neurodegenerative diseases (Anderson & Nieman, 2016; Chedraui & Pérez-López, 2013; Estruch, 2014) such as AD, where the risk is reduced by almost 10%, as oxidative stress, inflammation, and beta-amyloid accumulation decrease (Samadi,

Moradi, Moradinazar, Mostafai, & Pasdar, 2019). Among individuals who present mild cognitive impairment, a greater adherence to this diet reduces the risk of progression to AD by 48% (Dussailant, Echeverría, Urquiaga, Velasco, & Rigotti, 2016), by covering their energy requirements (Henderson et al., 2009). Furthermore, the Mediterranean diet is associated with a lower probability of PE, and a low adherence to it with an earlier age of the onset of the disease (Alcalay et al., 2012).

Additionally, all these benefits are mainly based on its antioxidant activity. Evidence of oxidative stress in neurodegenerative diseases indicates the potential role of antioxidants in the Mediterranean diet (Russo et al., 2014). In this sense, the phenols of *Olea europaea L.*, found in extra virgin olive oil and that exert strong antioxidant properties, are able to counteract oxidative stress in the brain tissue and reduce inflammation producing a certain protective effect in AD, PE, MS, and ALS (Rodríguez-Morató et al., 2016). In fact, oleuropein and HT (as discussed above) act as direct eliminators of free radicals; HT and oleocanthal are strong inhibitors of cyclooxygenases (COX), and oleuropein counteracts the oxidation of low-density lipoproteins (LDL) (Angeloni, Malaguti, Barbalace, & Hrelia, 2017), which would explain the benefit of consumption while suffering from these diseases.

This means that oxidative stress must be taken into account, not as an isolated process, but associated with other related aspects or deriving in part from it, specifically highlighting the inflammatory process. A risk factor for chronic diseases including neurodegenerative diseases is low-grade inflammation, characterized by high concentrations of inflammatory markers in the absence of overt symptoms. The intake of polyphenols reduces low-grade inflammation, as opposed to Western or meat-based diets, which on the contrary are associated with adverse health outcomes possibly due to the high content of proinflammatory foods and nutrients (Bonaccio et al., 2017; Medina-Remón, Kirwan, Lamuela-Raventós, & Estruch, 2018).

As for the activity of polyphenols, it has been observed that those found in virgin olive oil interfere in different ways in the amyloidosis that is fundamentally based on incorrect folding and aggregation of a series of peptides at an intra- and extracellular level, affecting cell physiology and viability. Specifically, polyphenols reduce this aggregation and its cytotoxic effects (Rigacci & Stefani, 2016).

Moreover, there are also findings in animal and human models that polyphenols may have a role in regulating neurotrophin levels, in particular nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), suggesting that polyphenols can induce their protective effects by potentiating the action of neurotrophins that stimulate growth, proliferation, survival, and neuronal differentiation (Carito et al., 2016).

In addition, among polyphenols, anthocyanins belong to the family of bioactive compounds called flavonoids (responsible for the red, purple, and blue colors of wine and many fruits, vegetables, and cereals). These are beneficial against a series of ischemic and degenerative conditions, being able to observe how anthocyanin

TABLE 2 Antioxidant effects of the Mediterranean diet in neurodegenerative diseases associated with nutrients

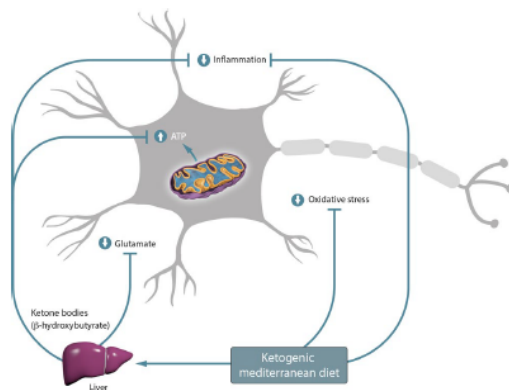
Author, year	Nutrient; antioxidant provided	Study design	Study Population	Proposed antioxidant activity
<b>Virgin olive oil</b>				
<i>Polyphenols (Hydroxytyrosol, oleuropein aglycone)</i>				
Kalaiselvan et al. (2016)	Olive oil; phenolic compounds (hydroxyl-tyrosol and tyrosol).	Randomized study.	Male Wistar rats.	Attenuation of hepatic lipid peroxidation and restoration of the redox balance of the antioxidant glutathione. Hydroxytyrosol and Tyrosol produce GSH activation in liver homogenates.
Kouka et al. (2017)	Olive oil (greek olea europea variety); total polyphenolic fraction and hydroxyl-tyrosol.	In vitro test.	Endothelial cells and murine C2C12 myoblasts.	Free radical scavenging. Improved redox status by increasing glutathione levels.
Grossi et al. (2013)	Extra virgin olive oil; Oleuropein aglycone.	Randomized study.	TgCRND8 mice.	Decreased neurotoxicity by induction of autophagy and recovery of the lysosomal system. OLE reduces astrocyte reaction, reducing inflammation.
<b>Fish and dairy products</b>				
<i>B Vitamins (B12 and B9)</i>				
Zoccolella et al. (2008)	Folate (vitamin B9) y vitamin B12.	Transversal study.	People suffering from ALS.	Decreased homocysteine concentration causing inflammatory damage and oxidation when in excess. Improvement of atrophy and mitochondrial activity in myocytes.
<b>Citrus juices, beer, red wine, green tea</b>				
<i>Phytochemicals (epigallocatechin, triterpenoids, xanthohumol, procyanidin, resveratrol)</i>				
Mancuso et al. (2014)	Resveratrol.	Randomized clinical study.	SOD1 (G93A) mice.	Promotes the survival of motor neurons by increasing Sirt1 activity. Greater expression and activation of SIRT 1 and AMPK. Resveratrol treatment normalizes autophagic flux. Resveratrol suppresses the activation of the NF- $\kappa$ B pathway in LPS-activated microglia by reducing the phosphorylation and consequent degradation of its inhibitor (I $\kappa$ B).
<b>Oily fish, eggs, seafood, dairy, nuts, vegetables and fruits</b>				
<i>Docosahexaenoic acid</i>				
Debbabi et al. (2017)	Fatty fish (sardines); docosahexaenoic acid (DHA).	Transversal study.	BV-2 murine microglial cells.	Attenuation of the toxic effects of 7-ketocholesterol (7KC from self-oxidation of cholesterol) using unsaturated fatty acids, based on the ability of an exogenous supply of unsaturated fatty acids to reduce the degradation of endogenous fatty acids.

supplementation counteracts the inflammatory response to stress conditions (Cerletti et al., 2017; Hornedo-Ortega et al., 2018). At the same time, polyphenols, together with B vitamins (folic acid, vitamin B6, and vitamin B12), which are also found in large quantities in this diet, decrease homocysteine concentrations that are elevated in patients with Alzheimer's disease (Zoccolella et al., 2008). Furthermore, oleuropein aglycone (OLE), enriched in extra virgin olive oil, protects against neurodegeneration in AD. In a study on OLE treatment, this decreased neurotoxicity and A $\beta$ -induced cognitive impairment by reducing plaque burden and consistency, as a result of a strong induction of autophagy with a recovery of the lysosomal system (whose dysfunction is one of the first alterations that occur in the disease) and the activation of microglia (Grossi et al., 2013). These findings confirm the benefits of the Mediterranean diet in AD, not only in slowing down its evolution, but also in preventing the disease. Dietary supplements such as polyphenols, B vitamins and polyunsaturated fatty acids are beneficial to improve the pathogenesis and the development of AD. Moreover, consuming

fish, fruits, vegetables, coffee, and alcohol in moderation reduces the risk of the disease onset. All these components are a fundamental part of the Mediterranean diet and highlight its ability to reduce the accumulation of beta-peptide amyloid (A $\beta$ ) and oxidative stress (Hu et al., 2014).

But, we do not only find polyphenol-type antioxidants in the Mediterranean diet. This diet also stands out for providing antioxidants of another nature such as tocopherols especially contained in nuts, lettuce, peas, wheat germ, vegetable oils, eggs, grapes, and wine, which act by deactivating the reactive species in their initial stages, preventing the oxidative process from continuing (Aguiló et al., 2005). Or also carotenoids found in strongly pigmented fruits and vegetables, such as carrots, tomatoes, and red peppers, react with peroxy radicals to form another less reactive radical that may react with another peroxy radical and finally lead to a nonreactive compound (Tur, 2004).

On the other hand, several beverages contain various natural compounds called phytochemicals, which exert antitumor,



**FIGURE 2** Activity proposal of the Mediterranean ketogenic diet on the different pathogenic mechanisms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

antiangiogenic, and antioxidant properties. Their consumption is related to better cognitive functions. Phytochemicals are found in different beverages: epigallocatechin in green tea, triterpenoids in citrus juices, xanthohumol in beer, procyanidin in chocolate, and caffeine and resveratrol in red wine. All these drinks are fundamental elements in the Mediterranean diet (Rossi et al., 2014). In particular, resveratrol is shown as one of the most promising antioxidants contained in the Mediterranean diet for ALS disease. This is due to the fact that improvements have been obtained at the cognitive level and increased survival of motor neurons by generating a great expression and activation of the SIRT1 and AMPK (Mancuso et al., 2014). This adds to the properties already demonstrated at the inflammatory level, by inhibiting the expression of certain cytokines and tumor necrosis factor (TNF). Resveratrol is also an antioxidant through the indirect activation of the Nrf2 pathway (regulatory protein of genes that produce antioxidant enzymes capable of neutralizing reactive oxygen species) (Alcalay et al., 2012; Angeloni et al., 2017).

Finally, the main fatty acids of the Mediterranean diet (oleic acid and docosahexaenoic acid) seem to attenuate the main toxic effects of 7-ketocholesterol (7KC) that occur due to the auto-oxidation of cholesterol. 7KC is found in plasma and/or cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative diseases and is believed to contribute to the activation of microglial cells involved in neurodegeneration (Debbabi et al., 2017; Johnson et al., 2008).

After analyzing the main works published in recent years with intervention in humans, animal models, or in vitro (Table 2), it can be concluded that the Mediterranean diet presents great benefits to treat and prevent oxidative stress in most neurodegenerative diseases.

All these antioxidant properties linked to its inflammatory activity and, alongside their capacity to produce KBs after hepatic beta oxidation as explained in this paper, make them a promising therapeutic strategy for ALS, by blocking the main pathogenic mechanisms of the disease that damage mitochondrial activity, being able to slow down the death of the motor neuron (Figure 2).

## 7 | CONCLUSIONS

The seriousness of ALS and the absence of a curative treatment make both the improvement in the evolution of the pathology, as well as in the prevention of its appearance, a challenge of current medicine. Consequently, taking into account the mitochondrial dysfunction in these patients and the main cause of motor neuron degeneration, it seems that a ketogenic alternative is promising since it interferes with the main pathogenic mechanisms of the disease.

In addition, it is interesting how ketogenesis can be produced, not only by following the typical ketogenic diet, but also alongside Mediterranean diet with adaptations such as food rich in MCTs, as in coconut oil, or a decrease in carbohydrates. This means there is a high source of KBs represented in a diet that, in addition, is characterized by great antioxidant properties, allowing to reduce the enormous level of inflammation derived mainly from oxidative stress evidenced at a neuronal level in ALS. In this sense, the main nutrients and antioxidants of the diet are analyzed in this study, outlining the activity of polyphenols contained mainly in olive oil and red wine (main bastions of the diet), which through different mechanisms manage to diminish the oxidation and inflammation of these pathologies.

## 8 | KEY FINDINGS

Ketone bodies, provided through a Mediterranean diet enriched with triglyceride-rich foods of medium chain and low carbohydrate, could be a therapeutic alternative for improving the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). These improvements are due to the neuroprotective capacity of these metabolites and the enormous antioxidant power of the Mediterranean diet due mainly to the polyphenols provided by nutrients such as olive oil, wine, nuts, or berries.

## ACKNOWLEDGMENTS

Author would like to thank Professor José María Lajara, Catholic University of Valencia "San Vicente Mártir," for his technical assistance in the design of figures.


## CONFLICT OF INTEREST

The author declares that I do not have any conflict of interest.

## ETHICAL APPROVAL

This study does not involve any human or animal testing.

## ORCID

Eraci Drehmer-Rieger  <https://orcid.org/0000-0003-0689-2399>  
María Mar López-Rodríguez  <https://orcid.org/0000-0001-8810-520X>

## REFERENCES

Achanta, L. B., & Rae, C. D. (2017).  $\beta$ -Hydroxybutyrate in the brain: One molecule. *Multiple Mechanisms. Neurochemical Research*, 42(1), 35–49. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2099-2>

- Aguiló, A., Tauler, P., Fuentespina, E., Tur, J. A., Córdova, A., & Pons, A. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & Behavior*, *84*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.07.034>
- Ahmed, K., Tunaru, S., & Offermanns, S. (2009). GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *30*(11), 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.09.001>
- Alcalay, R. N., Gu, Y., Mejia-Santana, H., Cote, L., Marder, K. S., & Scarmeas, N. (2012). The association between Mediterranean diet adherence and Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *27*(6), 771–774. <https://doi.org/10.1002/mds.24918>
- Alvarez-Sala Walther, L. A., Millán Núñez-Cortés, J., & de Oya Otero, M. (1996). The Mediterranean diet in Spain. Legend or reality? (II). Other elements in the Mediterranean diet: Vegetables and fruits, fish. Evolution of the diet and cardiovascular diseases in Spain in the last decades. *Revista Clínica Española*, *196*(9), 636–646.
- Anderson, J. J. B., & Nieman, D. C. (2016). Diet quality—the greeks had it right!. *Nutrients*, *8*(10), 636. <https://doi.org/10.3390/nu8100636>
- Angeloni, C., Malaguti, M., Barbalace, M. C., & Hrelia, S. (2017). Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*, <https://doi.org/10.3390/ijms18112230>
- Ari, C., Poff, A. M., Held, H. E., Landon, C. S., Goldhagen, C. R., Mavromates, N., & D'Agostino, D. P. (2014). Metabolic therapy with deanna protocol supplementation delays disease progression and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mouse model. *PLoS ONE*, *9*(7), e103526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103526>
- Barařano, K. W., & Hartman, A. L. (2008). The ketogenic diet: Uses in epilepsy and other neurologic illnesses. *Current Treatment Options in Neurology*, *10*(6), 410–419. <https://doi.org/10.1007/s11940-008-0043-8>
- Barros, L. F., San Martín, A., Sotelo-Hitschfeld, T., Lerchundi, R., Fernández-Moncada, I., Ruminot, I., ... Espinoza, D. (2013). Small is fast: Astrocytic glucose and lactate metabolism at cellular resolution. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 27. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00027>
- Beal, M. F., Lang, A. E., & Ludolph, A. C. (2005). *Neurodegenerative diseases: Neurobiology, pathogenesis and therapeutics* (Vol. 77). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Biasi, F., Deiana, M., Guina, T., Gamba, P., Leonarduzzi, G., & Poli, G. (2014). Wine consumption and intestinal redox homeostasis. *Redox Biology*, *2*, 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.008>
- Blasco, H., Corcia, P., Moreau, C., Veau, S., Fournier, C., Vour'h, P., ... Andres, C. R. (2010). <sup>1</sup>H-NMR-Based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, *5*(10), e13223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013223>
- Bonaccio, M., Pounis, G., Cerletti, C., Donati, M. B., Iacoviello, L., & de Gaetano, G. (2017). Mediterranean diet, dietary polyphenols and low grade inflammation: Results from the MOLI-SANI study. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *83*, 107–113. <https://doi.org/10.1111/bcp.12924>
- Cahill, G. F. J. (2006). Fuel metabolism in starvation. [Review] [82 refs]. *Annual Review of Nutrition*, *26*, 1–22.
- Carito, V., Ceccanti, M., Tarani, L., Ferraguti, G., Chaldakov, G. N., & Fiore, M. (2016). Neurotrophins' modulation by olive polyphenols. *Current Medicinal Chemistry*, *23*(28), 3189–3197. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160627104022>
- Carri, M. T., Ferri, A., Battistoni, A., Famhy, L., Gabbianelli, R., Poccia, F., & Rotilio, G. (1997). Expression of a Cu, Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Letters*, *414*(2), 365–368. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01051-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01051-X)
- Caruana, M., Cauchi, R., & Vassallo, N. (2016). Putative role of red wine polyphenols against brain pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Frontiers in Nutrition*, *3*, 31. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00031>
- Cassarino, D. S., Cassarino, D. S., Bennett, J. P., & Bennett, J. P. (1999). An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: Mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Research Reviews*, *29*(1), 1–25.
- Cerletti, C., De Curtis, A., Bracone, F., Digesù, C., Morganti, A. G., Iacoviello, L., ... Donati, M. B. (2017). Dietary anthocyanins and health: Data from FLORA and ATHENA EU projects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *83*(1), 103–106. <https://doi.org/10.1111/bcp.12943>
- Chedraui, P., & Pérez-López, F. R. (2013). Nutrition and health during mid-life: Searching for solutions and meeting challenges for the aging population. *Climacteric*, *16*(S1), 85–95. <https://doi.org/10.3109/13697137.2013.802884>
- Cheng, B., Yang, X., An, L., Gao, B., Liu, X., & Liu, S. (2009). Ketogenic diet protects dopaminergic neurons against 6-OHDA neurotoxicity via up-regulating glutathione in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Research*, *1286*, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.060>
- Colombo, F., Di Lorenzo, C., Regazzoni, L., Fumagalli, M., Sangiovanni, E., Peres De Sousa, L., ... Dell'Agli, M. (2019). Phenolic profiles and anti-inflammatory activities of sixteen table grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. *Food and Function*, *10*(4), 1797–1807. <https://doi.org/10.1039/c8fo02175a>
- de Pablos, R. M., Espinosa-Oliva, A. M., Hornedo-Ortega, R., Cano, M., & Arguelles, S. (2019). Hydroxytyrosol protects from aging process via AMPK and autophagy; a review of its effects on cancer, metabolic syndrome, osteoporosis, immune-mediated and neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, *143*, 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.005>
- Debbabi, M., Zarrouk, A., Bezine, M., Meddeb, W., Nury, T., Badreddine, A., ... Lizard, G. (2017). Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxiaoptophagy in microglial BV-2 cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, *207*(Pt B), 151–170. <https://doi.org/10.1016/j.chempophyslip.2017.04.002>
- Deng-Bryant, Y., Prins, M. L., Hovda, D. A., & Harris, N. G. (2011). Ketogenic diet prevents alterations in brain metabolism in young but not adult rats after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, *28*(9), 1813–1825. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.1822>
- Desport, J. C., Preux, P. M., Truong, C. T., Courat, L., Vallat, J. M., & Couratier, P. (2000). Nutritional assessment and survival in ALS patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders: Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, *1*(2), 91–96.
- Dinu, M., Pagliai, G., Casini, A., & Sofi, F. (2018). Mediterranean diet and multiple health outcomes: An umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, *72*, 30–43. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2017.58>
- Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, *81*(3), 163–221.
- Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., de Aguilar, J.-L.-G., & Loeffler, J.-P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(30), 11159–11164. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402026101>
- Dussailant, C., Echeverría, G., Urquiaga, I., Velasco, N., & Rigotti, A. (2016). Evidencia actual sobre los beneficios de la dieta mediterránea en salud. *Revista Médica De Chile*, *144*(8), 990–997. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872016000800012>

- Edmond, J., Robbins, R. A., Bergstrom, J. D., Cole, R. A., & de Vellis, J. (1987). Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *Journal of Neuroscience Research*, 18(4), 551–561. <https://doi.org/10.1002/jnr.490180407>
- Esposito, E., Rotilio, D., Di Matteo, V., Di Giulio, C., Cacchio, M., & Algeri, S. (2002). A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 719–735. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00078-7)
- Estruch, R. (2014). Cardiovascular mortality: how can it be prevented? *Nefrologia*, 34(5), 561–569. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2014.Apr.12481>
- Ferrante, R. J., Browne, S. E., Shinobu, L. A., Bowling, A. C., Baik, M. J., MacGarvey, U., ... Beal, M. F. (2002). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 69(5), 2064–2074. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69052064.x>
- Ferri, A., Cozzolino, M., Crosio, C., Nencini, M., Casciati, A., Gralla, E. B., ... Carri, M. T. (2006). Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), 13860–13865. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605814103>
- Fosslien, E. (2001). Mitochondrial medicine—molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 31(1), 25–67.
- Goldberg, E. L., Asher, J. L., Molony, R. D., Shaw, A. C., Zeiss, C. J., Wang, C., ... Dixit, V. D. (2017).  $\beta$ -Hydroxybutyrate deactivates neutrophil NLRP3 inflammasome to relieve gout flares. *Cell Reports*, 18(9), 2077–2087. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.004>
- Gordon, P. (2013). Amyotrophic lateral sclerosis: An update for 2013 clinical features, pathophysiology, management and therapeutic trials. *Aging and Disease*, 04(05), 295–310. <https://doi.org/10.14336/AD.2013.0400295>
- Graff, E. C., Fang, H., Wanders, D., & Judd, R. L. (2016). Anti-inflammatory effects of the hydroxycarboxylic acid receptor 2. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 65, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.001>
- Greco, T., Glenn, T. C., Hovda, D. A., & Prins, M. L. (2016). Ketogenic diet decreases oxidative stress and improves mitochondrial respiratory complex activity. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(9), 1603–1613. <https://doi.org/10.1177/0271678X15610584>
- Grossi, C., Rigacci, S., Ambrosini, S., Ed Dami, T., Luccarini, I., Traini, C., Stefani, M. (2013). The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A $\beta$  plaque pathology. *PLoS ONE*, 8(8), e71702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071702>
- Gurney, M. E., Cutting, F. B., Zhai, P., Doble, A., Taylor, C. P., Andrus, P. K., & Hall, E. D. (1996). Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 39(2), 147–157. <https://doi.org/10.1002/ana.410390203>
- Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.010>
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs and Aging*, 18, 685–716. <https://doi.org/10.2165/00002512-200118090-00004>
- Hamasaki, H., Takeuchi, Y., Masui, Y., Ohta, Y., Abe, K., Yoshino, H., & Yanai, H. (2015). Development of diabetes in a familial amyotrophic lateral sclerosis patient carrying the I113T SOD1 mutation. *Neuroendocrinology Letters*, 36(5), 414–416.
- Heffernan, C., Jenkinson, C., Holmes, T., Feder, G., Kupfer, R., Leigh, P. N., ... Sidhu, P. (2004). Nutritional management in MND/ALS patients: An evidence based review. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 5, 72–83. <https://doi.org/10.1080/14666020410020349>
- Henderson, S. T., Vogel, J. L., Barr, L. J., Garvin, F., Jones, J. J., & Costantini, L. C. (2009). Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Nutrition and Metabolism*, 6(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-31>
- Hernández, Á., Castañer, O., Elosua, R., Pintó, X., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., ... Fitó, M. (2017). Mediterranean diet improves high-density lipoprotein function in high-cardiovascular-risk individuals. *Circulation*, 135(7), 633–643. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023712>
- Hernández-Ruiz, A., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E., Amiano, P., Sánchez, M. J., Dorronsoro, M., & Molina-Montes, E. (2018). Comparison of the Dietary Antioxidant Profiles of 21 a priori Defined Mediterranean Diet Indexes. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 118(12), 2254–2268.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2018.01.006>
- Hertz, L., Chen, Y., & Waagepetersen, H. S. (2015, July). Effects of ketone bodies in Alzheimer's disease in relation to neural hypometabolism,  $\beta$ -amyloid toxicity, and astrocyte function. *Journal of Neurochemistry*, 134, 7–20. <https://doi.org/10.1111/jnc.13107>
- Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., de Pablos, R. M., Krisa, S., Richard, T., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2018). Phenolic compounds characteristic of the mediterranean diet in mitigating microglia-mediated neuroinflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 373. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00373>
- Hu, T., He, X. W., Jiang, J. G., & Xu, X. L. (2014). Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1449–1455. <https://doi.org/10.1021/jf405820v>
- Hu, Z. G., Wang, H. D., Qiao, L., Yan, W., Tan, Q. F., & Yin, H. X. (2009). The protective effect of the ketogenic diet on traumatic brain injury-induced cell death in juvenile rats. *Brain Injury*, 23(5), 459–465. <https://doi.org/10.1080/02699050902788469>
- Islam, M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, 39, 73–82. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
- Johnson, E. J., McDonald, K., Caldarella, S. M., Chung, H., Troen, A. M., & Snodderly, D. M. (2008). Cognitive findings of an exploratory trial of docosahexaenoic acid and lutein supplementation in older women. *Nutritional Neuroscience*, 11(2), 75–83. <https://doi.org/10.1179/147683008x301450>
- Józwiak, S., Kossoff, E. H., & Kotulska-Józwiak, K. (2011). Dietary treatment of epilepsy: Rebirth of an ancient treatment. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 45(4), 370–378. [https://doi.org/10.1016/S0028-3843\(14\)60108-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3843(14)60108-0)
- Kalaiselvan, I., Samuthirapandi, M., Govindaraju, A., Sheeja Malar, D., & Kasi, P. D. (2016). Olive oil and its phenolic compounds (hydroxytyrosol and tyrosol) ameliorated TCDD-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of oxidative stress and apoptosis. *Pharmaceutical Biology*, 54(2), 338–346. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1042980>
- Karbowski, J. (2007). Global and regional brain metabolic scaling and its functional consequences. *BMC Biology*, 5, <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-18>
- Kasarskis, E. J., Berryman, S., Vanderleest, J. G., Schneider, A. R., & McClain, C. J. (1996). Nutritional status of patients with amyotrophic lateral sclerosis: Relation to the proximity of death. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63(1), 130–137. <https://doi.org/10.1093/ajcn/63.1.130>
- Koloverou, E., Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Georgousopoulou, E. N., Grekas, A., ... Stefanadis, C. (2016). Adherence to Mediterranean diet and 10-year incidence (2002–2012) of diabetes: Correlations with inflammatory and oxidative stress biomarkers in the ATTICA cohort study. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(1), 73–81. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2672>
- Kong, G., Huang, Z., Ji, W., Wang, X., Liu, J., Wu, X., ... Zhu, Q. (2017). The Ketone Metabolite  $\beta$ -hydroxybutyrate attenuates oxidative stress in spinal cord injury by suppression of class I histone deacetylases.

- Journal of Neurotrauma*, 34(18), 2645–2655. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5192>
- Körner, S., Bösel, S., Thau, N., Rath, K. J., Dengler, R., & Petri, S. (2013). Differential sirtuin expression patterns in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) postmortem tissue: Neuroprotective or neurotoxic properties of sirtuins in ALS? *Neurodegenerative Diseases*, 11(3), 141–152. <https://doi.org/10.1159/000338048>
- Kouka, P., Priftis, A., Stagos, D., Angelis, A., Stathopoulos, P., Xinos, N., ... Kouretas, D. (2017). Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 703–712. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3078>
- Kruman, I. I., Pedersen, W. A., Springer, J. E., & Mattson, M. P. (1999). ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Experimental Neurology*, 160(1), 28–39. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7190>
- Lahoz, C., Castillo, E., Mostaza, J., de Dios, O., Salinero-Fort, M., González-Alegre, T., ... Garcés, C. (2018). Relationship of the adherence to a Mediterranean diet and its main components with CRP levels in the Spanish population. *Nutrients*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/nu10030379>
- Lukasova, M., Malaval, C., Gille, A., Kero, J., & Offermanns, S. (2011). Nicotinic acid inhibits progression of atherosclerosis in mice through its receptor GPR109A expressed by immune cells. *Journal of Clinical Investigation*, 121(3), 1163–1173. <https://doi.org/10.1172/JCI41651>
- Mamelak, M. (2017). Energy and the Alzheimer brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 75, 297–313. <https://doi.org/10.1016/j.neubi.2017.02.001>
- Mancuso, R., del Valle, J., Modol, L., Martínez, A., Granado-Serrano, A. B., Ramírez-Núñez, O., ... Navarro, X. (2014). Resveratrol Improves Motoneuron Function and Extends Survival in SOD1G93A ALS Mice. *Neurotherapeutics: the Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 11(2), 419–432. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0253-y>
- Mattson, M. P., Cutler, R. G., & Camandola, S. (2007). Energy intake and amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroMolecular Medicine*, 9, 17–20. <https://doi.org/10.1385/NMM:9:1:17>
- McGarry, J. D., & Foster, D. W. (2003). Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annual Review of Biochemistry*, 49(1), 395–420. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.002143>
- Medina-Remón, A., Kirwan, R., Lamuela-Raventós, R. M., & Estruch, R. (2018). Dietary patterns and the risk of obesity, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases, asthma, and neurodegenerative diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 262–296. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1158690>
- Menzies, F. M., Ince, P. G., & Shaw, P. J. (2002). Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochemistry International*, 40(6), 543–551. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00125-5](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00125-5)
- Miller, R. G., Mitchell, J. D., Lyon, M., & Moore, D. H. (2003). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 4, 191–206. <https://doi.org/10.1080/14660820310002601>
- Morozova, N., Weisskopf, M. G., McCullough, M. L., Munger, K. L., Calle, E. E., Thun, M. J., & Ascherio, A. (2008). Diet and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Epidemiology*, 19(2), 324–337. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31816325d>
- Murata, T., Ohtsuka, C., & Terayama, Y. (2008). Increased mitochondrial oxidative damage in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 267(1–2), 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.09.038>
- Newman, J. C., & Verdin, E. (2014). Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.09.002>
- Niessen, H. G., Debska-Vielhaber, G., Sander, K., Angenstein, F., Ludolph, A. C., Hilfert, L., ... Vielhaber, S. (2007). Metabolic progression markers of neurodegeneration in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*, 25(6), 1669–1677. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05415.x>
- Offermanns, S. (2017). Hydroxy-carboxylic acid receptor actions in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.11.007>
- Okamoto, K., Kihira, T., Kondo, T., Kobashi, G., Washio, M., Sasaki, S., ... Nagai, M. (2007a). Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 8(5), 300–304. <https://doi.org/10.1080/17482960701472249>
- Okamoto, K., Kihira, T., Kondo, T., Kobashi, G., Washio, M., Sasaki, S., ... Nagai, M. (2007b). Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 8(5), 300–304. <https://doi.org/10.1080/17482960701472249>
- Paganoni, S., Deng, J., Jaffa, M., Cudkowicz, M. E., & Wills, A. M. (2011). Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, 44(1), 20–24. <https://doi.org/10.1002/mus.22114>
- Palamici, L., Schlagowski, A., Ngo, S. T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., ... René, F. (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Molecular Medicine*, 7(5), 526–546. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404433>
- Paoli, A., Bianco, A., Damiani, E., & Bosco, G. (2014). Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases. *BioMed Research International*, 2014, 474296. <https://doi.org/10.1155/2014/474296>
- Paoli, A., Cenci, L., & Grimaldi, K. A. (2011). Effect of ketogenic Mediterranean diet with phytoextracts and low carbohydrates/high-protein meals on weight, cardiovascular risk factors, body composition and diet compliance in Italian council employees. *Nutrition Journal*, 10(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-112>
- Paoli, A., Moro, T., Bosco, G., Bianco, A., Grimaldi, K. A., Camporesi, E., & Mangar, D. (2015). Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids ( $\omega$ -3) supplementation on some cardiovascular risk factors with a ketogenic Mediterranean diet. *Marine Drugs*, 13(2), 996–1009. <https://doi.org/10.3390/md13020996>
- Pehowich, D. J., Gomes, A. V., & Barnes, J. A. (2000). Fatty acid composition and possible health effects of coconut constituents. *The West Indian Medical Journal*, 49(2), 128–133.
- Pérez-Guisado, J., Muñoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, Á. (2008). Spanish Ketogenic Mediterranean diet: A healthy cardiovascular diet for weight loss. *Nutrition Journal*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-7-30>
- Pérez-Jiménez, J., Elena Díaz-Rubio, M., & Saura-Calixto, F. (2015). Contribution of macromolecular antioxidants to dietary antioxidant capacity: A study in the Spanish Mediterranean diet. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 365–370. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0513-6>
- Perng, B. C., Chen, M., Perng, J. C., & Jambazian, P. (2017). A Keto-Medit approach with coconut substitution and exercise may delay the onset of Alzheimer's disease among middle-aged. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 4(1), 51–57. <https://doi.org/10.14283/jpad.2016.104>
- Polkey, M. I., Lyall, R. A., Moxham, J., & Leigh, P. N. (1999). Respiratory aspects of neurological disease. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 66, 5–15. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.1.5>
- Pradat, P.-F., & Dib, M. (2009). Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 13(2), 115–125. <https://doi.org/10.1007/bf03256320>
- Puchalska, P., & Crawford, P. A. (2017). Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics.

- Cell Metabolism*, 25, 262–284. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.022>
- Rigacci, S., & Stefani, M. (2016). May 31). Nutraceutical properties of olive oil polyphenols. An itinerary from cultured cells through animal models to humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 843. <https://doi.org/10.3390/ijms17060843>
- Robberecht, W., & Philips, T. (2013). April). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience*, 14, 248–264. <https://doi.org/10.1038/nrn3430>
- Robinson, A. M., & Williamson, D. H. (2017). Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiological Reviews*, 60(1), 143–187. <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.1.143>
- Rodríguez-Morató, J., Boronat, A., Kotronoulas, A., Pujadas, M., Pastor, A., Olesti, E., ... de la Torre, R. (2016). Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: Hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metabolism Reviews*, 48, 218–236. <https://doi.org/10.1080/03602532.2016.1179754>
- Rossi, M., Caruso, F., Kwok, L., Lee, G., Caruso, A., Gionfra, F., ... Incerpi, S. (2017). Protection by extra virgin olive oil against oxidative stress in vitro and in vivo. Chemical and biological studies on the health benefits due to a major component of the Mediterranean diet. *PLoS ONE*, 12(12), e0189341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189341>
- Rossi, T., Gallo, C., Bassani, B., Canali, S., Albini, A., & Bruno, A. (2014). Drink your prevention: Beverages with cancer preventive phytochemicals. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 124(12), 713–722. <https://doi.org/10.20452/pamw.2560>
- Ruskin, D. N., Kawamura, M., & Masino, S. A. (2009). Reduced pain and inflammation in juvenile and adult rats fed a ketogenic diet. *PLoS ONE*, 4(12), e8349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008349>
- Russo, M. A., Sansone, L., Polletta, L., Runci, A., Rashid, M. M., De Santis, E., ... Tafani, M. (2014). Sirtuins and resveratrol-derived compounds: A model for understanding the beneficial effects of the Mediterranean diet. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 14(4), 300–308.
- Samadi, M., Moradi, S., Moradinazar, M., Mostafai, R., & Pasdar, Y. (2019). Dietary pattern in relation to the risk of Alzheimer's disease: A systematic review. *Neurological Sciences*, <https://doi.org/10.1007/s10072-019-03976-3>
- Sarna, L. K., Sid, V., Wang, P., Siow, Y. L., House, J. D., & O. K., (2016). Tyrosol attenuates high fat diet-induced hepatic oxidative stress: Potential involvement of cystathionine β-synthase and cystathionine γ-lyase. *Lipids*, 51(5), 583–590. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4084-y>
- Shaw, P. J., & Ince, P. G. (1997). Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 244(S2), S3–S14. <https://doi.org/10.1007/bf03160574>
- Silva, P., Sureda, A., Tur, J. A., Andreoletti, P., Cherkaoui-Malki, M., & Latruffe, N. (2019). How efficient is resveratrol as an antioxidant of the Mediterranean Diet, towards alterations during the aging process? *Free Radical Research*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1614176>
- Singh, R., Sharad, S., & Kapur, S. (2004). Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: Relevance of dietary antioxidants. *Journal of Indian Academy of Clinical Medicine*, 5(3), 218–225.
- Song, W., Song, Y., Kincaid, B., Bossy, B., & Bossy-Wetzel, E. (2013). Mutant SOD1G93A triggers mitochondrial fragmentation in spinal cord motor neurons: Neuroprotection by SIRT3 and PGC-1α. *Neurobiology of Disease*, 51, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.07.004>
- Stafstrom, C. E., & Rho, J. M. (2012). The Ketogenic Diet as a Treatment Paradigm for Diverse Neurological Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 59. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00059>
- Stanich, P., Chiapetta, A., Oliveria, A., & Gabbai, A. (2002). Nutritional supplements in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis Other Motor Neuron Disorders*, 3(Suppl 2), 119.
- Steele, M., Stuchbury, G., & Münch, G. (2007). The molecular basis of the prevention of Alzheimer's disease through healthy nutrition. *Experimental Gerontology*, 42(1–2), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.06.002>
- Sun, Y., Lu, C.-J., Chen, R.-C., Hou, W.-H., & Li, C.-Y. (2015). Risk of amyotrophic lateral sclerosis in patients with diabetes: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Journal of Epidemiology*, 25(6), 445–451. <https://doi.org/10.2188/jea.je20140176>
- Taylor, M. K., Swerdlow, R. H., Burns, J. M., & Sullivan, D. K. (2019). An experimental ketogenic diet for alzheimer disease was nutritionally dense and rich in vegetables and avocado. *Current Developments Nutrition*, 3(4), nzz003. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz003>
- Tefera, T. W., Wong, Y., Barkl-Luke, M. E., Ngo, S. T., Thomas, N. K., McDonald, T. S., & Borges, K. (2016). Triheptanoin protects motor neurons and delays the onset of motor symptoms in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 11(8), e0161816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161816>
- Tieu, K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D.-C., Yan, S.-D., ... Przedborski, S. (2003). D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *Journal of Clinical Investigation*, 112(6), 892–901. <https://doi.org/10.1172/JCI200318797>
- Tur, J. A. (2004). Los antioxidantes de la dieta mediterranea. *Spanish Journal of Community*, 4, 198–207. <https://doi.org/10.1007/s00394>
- Valko, K., & Ciesla, L. (2019). Amyotrophic lateral sclerosis. *Progress in Medicinal Chemistry*, 58, 63–117. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2018.12.001>
- Veech, R. L. (2014). Ketone ester effects on metabolism and transcription. *Journal of Lipid Research*, 55(10), 2004–2006. <https://doi.org/10.1194/jlr.046292>
- Veech, R. L., Bradshaw, P. C., Clarke, K., Curtis, W., Pawlosky, R., & King, M. T. (2017). Ketone bodies mimic the life span extending properties of caloric restriction. *IUBMB Life*, 69, 305–314. <https://doi.org/10.1002/iub.1627>
- Vining, E. P. G., Freeman, J. M., Ballaban-Gil, K., Camfield, C. S., Camfield, P. R., Holmes, G. L., ... Wheless, J. W. (1998). A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Archives of Neurology*, 55(11), 1433–1437. <https://doi.org/10.1001/archneur.55.11.1433>
- Wanders, D., Graff, E. C., White, B. D., & Judd, R. L. (2013). Niacin increases adiponectin and decreases adipose tissue inflammation in high fat diet-fed mice. *PLoS ONE*, 8(8), e71285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071285>
- Willett, W. C., Sacks, F., Trichopoulos, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E., & Trichopoulos, D. (1995). Mediterranean diet pyramid: A cultural model for healthy eating. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61(6), 1402S–1406S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.6.1402S>
- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., ... Price, D. L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, 14(6), 1105–1116. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90259-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90259-7)
- Yang, S. Y., He, X. Y., & Schulz, H. (1987). Fatty acid oxidation in rat brain is limited by the low activity of 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(27), 13027–13032.
- Youm, Y.-H., Nguyen, K. Y., Grant, R. W., Goldberg, E. L., Bodogai, M., Kim, D., ... Dixit, V. D. (2015). The ketone metabolite β-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature Medicine*, 21(3), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nm.3804>
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Lazarow, A., & Nissim, I. (2004). Ketogenic diet, brain glutamate metabolism and seizure control.

- Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70(3), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.07.005>
- Zhao, W., Varghese, M., Vempati, P., Dzhun, A., Cheng, A., Wang, J., ... Pasinetti, G. M. (2012). Caprylic triglyceride as a novel therapeutic approach to effectively improve the performance and attenuate the symptoms due to the motor neuron loss in ALS disease. *PLoS ONE*, 7(11), e49191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049191>
- Zhao, Z., Lange, D. J., Voustantiounk, A., MacGrogan, D., Ho, L., Suh, J., ... Pasinetti, G. M. (2006). A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neuroscience*, 7, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-29>
- Zoccolella, S., Simone, I. L., Lamberti, P., Samarelli, V., Tortelli, R., Serlenga, L., & Logroscino, G. (2008). Elevated plasma homocysteine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 70(3), 222–225. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000297193.53986.6f>

How to cite this article: Caplliure-Llopis J, Peralta-Chamba T, Carrera-Juliá S, et al. Therapeutic alternative of the ketogenic Mediterranean diet to improve mitochondrial activity in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): A Comprehensive Review. *Food Sci Nutr*. 2019;00:1–13. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1324>

## 9.2 Publicación 2.



# Poor Bone Quality in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis

Jordi Caplliure-Llopis<sup>1,2</sup>, Dolores Escrivá<sup>3</sup>, María Benlloch<sup>4</sup>,  
José Enrique de la Rubia Ortí<sup>4</sup>, José María Estrela<sup>5</sup> and Carlos Barrios<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>School of Doctorate, Valencia Catholic University, Valencia, Spain, <sup>2</sup>Primary Care Services, La Ribera University Hospital, Alzira, Spain, <sup>3</sup>Intensive Care Unit, La Fe Polytechnic and University Hospital, Valencia, Spain, <sup>4</sup>Department of Anatomy and Physiology, School of Medicine and Health Sciences, Valencia Catholic University, Valencia, Spain, <sup>5</sup>Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain, <sup>6</sup>Institute of Research on Musculoskeletal Disorders, Valencia Catholic University, Valencia, Spain

**Objective:** Musculoskeletal functional deterioration in Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is associated with an increase in bone fractures. The purpose of this study was to evaluate the influence of sex, ALS type, on bone quality in patients with ALS compared to healthy controls. The impact on bone health of the clinical status and some metabolic parameters was also analyzed in ALS patients.

**Methods:** A series of 33 voluntary patients with ALS, and 66 healthy individuals matched in sex and age underwent assessment of bone mass quality using quantitative ultrasound (QUS) of the calcaneus. Ultrasonic broadband attenuation (BUA), the speed of sound (SOS), stiffness index and *T*-score were measured. Bone mineral density (BMD) was estimated using standard equations. Apart from fat and muscle mass percentage determinations, clinical baseline measures in ALS patients included ALSFRS-R score, Barthel index for activities of daily living, pulmonary function measured using FVC, and muscular strength assessed by a modified MRC grading scale. Laboratory tests included serum calcium, 25-HO-cholecalciferol (Vitamin D), alkaline phosphatase (ALP), T4 and TSH.

**Results:** All bone parameters evaluated were statistically significant lower in ALS patients than in healthy controls. ALS females showed significantly lower bone parameters than healthy females. According to the estimated BMD, there were 25 ALS patients (75.8%) and 36 (54.5%) healthy individuals showing an osteoporotic profile (BMD <0.700 g/cm<sup>2</sup>). Only 16.7% of the ALS females had *T*-scores indicative of healthy bones. There was no correlation between any of the clinical parameters analyzed and the bone QUS measurements. Vitamin D and TSH levels positively correlated with all the bone parameters.

**Conclusions:** This study confirms that ALS patients, particularly females, exhibited deteriorated bone health as compared to healthy individuals. These structural bone changes were independent of ALS subtype and clinical status. Bone health in ALS patients seems to be related to certain metabolic parameters such as Vitamin D and TSH levels.

**Keywords:** amyotrophic lateral sclerosis, bone quality, neurodegeneration, osteoporosis, quantitative ultrasound (QUS) measurement, vitamin D

### OPEN ACCESS

**Edited by:**

Massimiliano Filosto,  
University of Brescia, Italy

**Reviewed by:**

Ettore Beghi,  
Mario Negri Pharmacological  
Research Institute (IRCCS), Italy  
Masahisa Katsuno,  
Nagoya University Hospital, Japan  
Cristina Moglia,  
University of Turin, Italy

**\*Correspondence:**

Carlos Barrios  
carlos.barrios@ucv.es  
orcid.org/0000-0002-6657-7246

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Neuromuscular Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Neurology

**Received:** 27 August 2020

**Accepted:** 23 November 2020

**Published:** 18 December 2020

**Citation:**

Caplliure-Llopis J, Escrivá D,  
Benlloch M, de la Rubia Ortí JE,  
Estrela JM and Barrios C (2020) Poor  
Bone Quality in Patients With  
Amyotrophic Lateral Sclerosis.  
Front. Neurol. 11:599216.  
doi: 10.3389/fneur.2020.599216

## INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease with progressive motor neuron damage leading to the death of the patients in a very short average time, from 16 months to 3 years after diagnosis (1). Epidemiologically, ALS is considered a rare disease with an annual incidence of 2–3 cases per 100,000 people (1). There are many studies that show an increased risk in males (male/female ratio of 1.5), indicating that a hormonal component could be involved. However, as age increases, the difference between men and women disappears (2–4).

From a clinical point of view, two main types of ALS are distinguished: bulbar and medullary, depending on whether the upper or lower motor neuron, respectively, is initially affected. In both cases, a series of characteristic signs and symptoms appear, reflecting progressive musculoskeletal deterioration. Muscular dysfunction at the thoracic level and subsequent respiratory failure usually are the final cause of death (5). Musculoskeletal functional deterioration in ALS is associated with an increase in bone fractures, due to a decrease in bone density (6–8).

Bone is an active organ in constant remodeling and direct interactions with the skeletal muscle. These muscles types provide certain anabolic stimuli for bone remodeling, and are source of osteogenic stem cells that play an important role in maintaining bone homeostasis (9, 10). In the opposite sense, bone is an important supplier of muscular trophic factors, including VEGF, FGF-2, BMP, and IGF-1 that are critical for the maintenance of muscle homeostasis. Furthermore, the shape of the bones is constantly regulated by muscle strength, so when muscle dysfunction occurs, such as in the early stages of ALS, bone morphology can be altered (11). Similarly, the alteration of bone homeostasis could exacerbate muscle degeneration and accelerate the progression of the disease. By contrast, the preserved paracrine release of VEGF by the mesenchymal stem cells (MSCs) of the bone marrow may improve muscle regeneration (11). In this sense, the MSCs of patients with ALS produce fewer trophic factors (12, 13). The results of these studies suggest a possible interaction between muscle and bone during the progression of ALS disease.

Based on the previous findings, the objective of this study was to analyze the bone quality of patients with ALS in relation to sex, ALS type, and age.

## MATERIALS AND METHODS

### Participants

This is cross-sectional descriptive study of bone quality on patients with ALS disease that were included in the list to initiate a single-center, randomized, double-blinded, registered clinical trial (ClinicalTrials.gov, NCT03489200). Participants fulfilled the following inclusion criteria: age over 18-years-old, diagnosed with ALS according to the criteria of El Escorial (14) (sporadic or familial), with symptoms persisting more than 6 months, and both sexes. The clinical subtype of ALS, bulbar

or spinal, was taken from the clinical records. Those females who were breastfeeding or pregnant at the time of the study were excluded. At the time of evaluation, all patients were taking Riluzole® according to the standard dose prescribed by their neurologist. After applying the selection criteria, a total of 33 patients participated in the study. The patients were affiliated to the Spanish Foundation for Research on ALS (FUNDELA). All participants provided their written and voluntary consent.

A control group of 66 healthy individuals within the same range of age and similar sex distribution than the group of ALS patients was recruited to participate in the study. The ALS/healthy controls ratio was 1:2 maintaining similar proportion of males and females in the control group than the incidence of the disease by sex observed in ALS group. Similar to patients with ALS, all then voluntarily agreed to be involved in the study, after the objectives of the project and procedures were explained to them.

The study was developed in accordance with the Declaration of Helsinki (15) after approval of the protocol by the Human Research Committee of the Commission for Ethics in Experimental Research of the University of Valencia (reference number H1479983999044).

### Anthropometric, Clinical and Metabolic Measurements

The weight and height of each participant were measured and recorded using the same standardized equipment under regular calibration. The body mass index (BMI) was calculated with the weight (kg) divided by the square of the height in meters (m<sup>2</sup>). In ALS patients, fat and muscle mass percentage were obtained according to standard procedures (16). The main clinical baseline measures included the ALSFRS-R score (17), Barthel index for activities of daily living, pulmonary function measured using FVC, and muscular strength assessed by a modified 11-step MRC grading scale (18). MRC scoring was obtained in each patient for 8 different muscle: right and left biceps, triceps, quadriceps and tibial. To calculate the total MRC scale index, a progressively increasing number from 0 (0 in the MRC scale) to 10 (5 in the MRC scale) was given to each step and each muscle. The total MRC index per patient corresponds to the sum of the numbers given to all the eight muscles. Laboratory tests included serum calcium, 25-HO-cholecalciferol (Vitamin D), alkaline phosphatase (ALP), T4 and TSH.

### Assessment of Bone Quality

Quantitative ultrasound measurement (QUS) was used for the evaluation of bone mass parameters using the Lunar Achilles Insight device (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). This technique was chosen for its ability to estimate bone quality in a short time, ease of application and reproducibility and the absence of adverse effects.

The Lunar Achilles Insight device is a portable device that allows a quick estimate of two basic parameters: the ultrasonic broadband attenuation (BUA) and the speed of sound (SOS). BUA refers to the absorption of energy by bone and soft

tissue when sound waves travel through them; an increase in BUA correlates with increased bone trabecula content and the unit is dB/MHz. The SOS parameter refers to the ratio of the length of the body part studied to the transmission time of the sound waves. Its increase is correlated with reduced bone mineral content. The unit of measurement is meters per second (m/s) (19). Both ultrasound parameters constitute a clinical variable called stiffness index (SI). The SI is expressed as a percentage of the mean value in a young adult and is calculated as follows: Stiffness index =  $0.67 \times (BUA) = 0.28 \times (SOS) - 420$ . This parameter should not be confused with the biomechanical term. The SI has been used to determine the risk of osteoporotic fractures as has been shown to produce better effective precision than BUA or SOS alone and is also comparable to bone mineral density measured by the DXA method (20, 21).

Two ultrasound evaluations of the calcaneus of each subject under study were carried out and the mean of both values was later calculated. All ultrasound measurements were performed by the same operator, thus avoiding biases in obtaining the data. To obtain the bone mass, the instructions specified by the manufacturer were followed, spraying the calcaneus area with 70° alcohol and correct foot placement. The measurements were always made on the dominant foot. In our laboratory, the intra-operator variability for BUA and SOS was 13.7 and 3.2%, respectively. In accordance with the WHO criteria for BUA, T-scores equal to or <-1.5 were considered an indication of osteoporosis (22). The estimated heel BMD was calculated using the equation  $BMD = 33 \times (BUA + SOS) - 3.687$  (23). Data were collected at clinical facilities dependent on the Catholic University San Vicente Martir (Valencia, Spain).

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS version 21 software package (IBM Corporation, Chicago, IL, USA). Quantitative values were expressed as mean, standard deviation (SD), and 95% confidence intervals. The Gaussian distribution

of the variables was evaluated using the Shapiro-Wilk test. Due to the limited sample size, comparisons between groups were made by using the Mann-Whitney U non-parametric test. A sub-analysis of the sample regarding sex and ALS subtype, bulbar or spinal, was also performed. Spearman's rho correlation coefficients were calculated to assess the possible relationship between bone quality parameters and anthropometric variables.  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

### RESULTS

The total population that was finally included in the study was 99 individuals (33 ALS patients and 66 healthy controls). Age and the general anthropometric characteristics of the series are shown in Table 1 including date discriminated by sex. The proportion of males was similar (63.6%) in both ALS and healthy controls series. Considering the mix sample of males and females, there were statistically significant differences either in weight ( $p < 0.01$ ) and BMI ( $p < 0.05$ ) between the two groups. Both males and females with ALS showed lower weight and BMI than healthy participants. Differences were only statistically significant comparing males of both groups ( $p < 0.01$  for weight, and  $p < 0.05$  for BMI). Healthy males were slightly younger than ALS males, and healthy females slightly older than ALS counterparts, but there were no statistically significant differences.

### Clinical Characteristics of ALS Patients

The clinical profile of the ALS patients included in the study are summarized in Table 2. Discrimination of data according to sex was also indicated. Regarding the type of ALS, 22 patients debuted with spinal disease and 11 with primary bulbar symptoms. No differences were found in the distribution of ALS clinical type by sex (Fisher's exact test;  $p = 0.471$ ). The mean duration of symptoms was 2 years and the shorter period was 6 months. When discriminating by sex, the duration of symptoms was longer in males than

**TABLE 1 |** Age and general anthropometric characteristics of healthy controls and ALS patients included in the study and discriminated by sex.

	Healthy controls			ALS			Healthy vs. ALS		
	Mean ± SD (95% CI)			Mean ± SD (95% CI)			Z (p) Mann-Whitney U-test		
	Total sample (n = 66)	Males (n = 42)	Females (n = 24)	Total sample (n = 33)	Males (n = 21)	Females (n = 12)	Total sample	Males	Females
Age (years)	54.6 ± 8.1 (52.6–56.7)	53.6 ± 7.2 (51.4–55.8)	56.5 ± 9.5 (52.5–60.5)	55.6 ± 10.6 (51.7–59.4)	56.3 ± 10.8 (51.2–61.4)	54.2 ± 10.4 (47.6–60.8)	–0.008 (0.994)	–0.482 (0.630)	–1.025 (0.305)
Weight (Kg)	75.8 ± 12.6 (72.7–78.9)	82.4 ± 9.3 (79.5–85.3)	64.4 ± 8.9 (60.6–68.2)	69.0 ± 9.1 (65.7–72.2)	73.4 ± 7.6 (69.9–76.8)	61.2 ± 5.9 (57.4–65.0)	–2.629 (0.009)**	–3.401 (0.001)**	–0.672 (0.501)
Height (cm)	170.4 ± 8.4 (168.3–172.5)	174.8 ± 6.2 (172.9–176.8)	162.6 ± 5.5 (160.3–165.0)	168.3 ± 8.5 (165.3–171.4)	172.0 ± 7.1 (168.7–175.3)	162.3 ± 7.4 (157.6–167.1)	–1.198 (0.263)	–1.569 (0.117)	–0.286 (0.775)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.0 ± 3.2 (25.2–26.8)	26.9 ± 2.7 (26.1–27.8)	24.3 ± 3.4 (22.9–25.8)	24.4 ± 2.7 (23.4–25.4)	25.1 ± 2.5 (23.9–26.2)	23.3 ± 2.8 (21.5–25.1)	–2.201 (0.028)*	–0.520 (0.021)*	–0.523 (0.603)

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

**TABLE 2 |** Clinical profile and laboratory parameters of ALS patients.

	ALS patients Mean $\pm$ SD (95% CI)			Males vs. Females Mann-Whitney U-test
	Total sample (n = 33)	Males (n = 21)	Females (n = 12)	Z (p)
<b>Clinical profile</b>				
Spinal/bulbar	22/11	15/6	7/5	
Duration of symptoms (months)	24.1 $\pm$ 17.8 (17.5–30.6)	28.1 $\pm$ 19.6 (18.9–37.3)	16.9 $\pm$ 11.4 (9.1–24.5)	–1.514 (0.130)
ALSFRS-R score	34.9 $\pm$ 8.8 (31.3–38.4)	34.4 $\pm$ 10.1 (20.3–39.4)	36.1 $\pm$ 5.2 (31.7–40.5)	–0.056 (0.978)
Barthel index	75.3 $\pm$ 22.9 (63.8–86.7)	79.1 $\pm$ 24.0 (63.9–94.4)	67.5 $\pm$ 20.4 (46.0–88.9)	–1.100 (0.271)
FEV%	77.0 $\pm$ 13.9 (68.9–85.0)	80.3 $\pm$ 13.2 (70.8–89.7)	68.7 $\pm$ 13.5 (47.4–90.3)	–1.346 (0.178)
Fat%	18.2 $\pm$ 3.8 (16.4–19.9)	16.9 $\pm$ 2.8 (15.4–18.5)	21.1 $\pm$ 4.8 (16.1–26.1)	–2.258 (0.024)*
Muscle%	36.8 $\pm$ 3.1 (32.2–40.6)	37.0 $\pm$ 2.8 (35.4–38.3)	36.4 $\pm$ 3.9 (32.2–40.6)	–0.467 (0.640)
MRC global score	58.2 $\pm$ 16.4 (50.7–65.7)	59.6 $\pm$ 17.0 (49.7–69.3)	55.6 $\pm$ 16.0 (40.7–70.3)	–0.674 (0.500)
<b>Laboratory parameters</b>				
25-OH-Vit D (ng/mL)	21.8 $\pm$ 7.8 (15.8–27.8)	22.5 $\pm$ 7.3 (15.6–29.3)	19.5 $\pm$ 12.1 (9.1–28.2)	–0.586 (0.558)
Calcium (mg/dL)	9.4 $\pm$ 0.3 (9.2–9.6)	9.5 $\pm$ 0.2 (9.3–9.6)	9.3 $\pm$ 0.5 (8.5–10.1)	–0.588 (0.570)
Alkaline phosphatase U/L	64.3 $\pm$ 21.1 (54.4–74.1)	65.1 $\pm$ 22.3 (52.7–77.5)	61.8 $\pm$ 18.7 (38.5–85.1)	–0.087 (0.930)
T4 (ng/dL)	1.9 $\pm$ 2.3 (0.45–3.4)	1.1 $\pm$ 0.2 (0.9–1.2)	3.3 $\pm$ 3.60 (–2.4–9.1)	–2.457 (0.014)*
TSH (uU/mL)	1.6 $\pm$ 0.6 (1.3–1.9)	1.7 $\pm$ 0.5 (1.3–1.9)	1.5 $\pm$ 0.8 (0.8–2.3)	–0.463 (0.663)

\* $p < 0.05$ .

in females, without statistically significant differences. Females with ALS showed slightly ALSFRS-R scores and slightly lower Barthel index than males, but without statistically significant differences. These data indicated that the clinical status of males and females with ALS was almost similar. There were no differences either in FEV% and muscle%. However, ALS females showed higher fat% than males ( $p < 0.05$ ). Regarding laboratory parameters, Ca, ALP, and TSH values were quite similar, both within the range of normality. However, mean values of Vitamin D were in the low range of normality, with 44.4% of patients showing clear Vitamin D levels below the normality ( $<20$  ng/l). Surprisingly, T4 values were lower in males than in females ( $p < 0.05$ ) besides no differences in TSH values.

### Bone Parameters

Table 3 shows the results of the QUS evaluation and the estimated BMD in the two groups, including data discriminated

by sex. There were differences between the total samples of both groups in all the bone parameters analyzed. Except in healthy control males, the mean estimated BMD were below the values considered as indicator of osteoporosis ( $<0.700$  g/cm<sup>2</sup>) but were lower in ALS patients ( $p = 0.012$ ). There were 25 ALS patients (75.8%) who BMD values indicative of osteoporosis and 36 (54.5%) healthy individuals (Fisher's exact test,  $p < 0.05$ ).

When analyzing QUS bone parameters according to sex, no significant differences were surprisingly found in any of the parameters between males of the ALS group compared to those of the control group (Table 3). Slightly higher values were observed in all bone parameters of the healthy males, especially in BUA, T-scores and estimated BMD. However, when comparing females, those with ALS exhibited statistically significant lower values than healthy women in all the determined bone parameters. Among ALS females, values were much lower in BUA, SOS, SI, and T-score.

On the basis of the T-score alone, 51.5% (15/33) of the ALS patients showed values below  $-1.5$ , considered as indicators of osteopenia when using QUS examinations. In the control group only 4 individuals (6.1%) had a T-score of below 1.5 and all 4 were males. The differences between the ALS and control groups in the proportion of osteopenic individuals was highly significant ( $p < 0.0001$ ). Only 16.7% of the ALS females (2/12) had T-scores indicative of healthy bones.

Concerning the BMD estimated values according to sex, no significant differences were obtained between the men in the control group and those in the ALS group. Among females, those with ALS exhibited much lower BMD values than healthy women ( $p = 0.001$ ). Most of the ALS females were within the range of BMD considered as osteoporosis (11/12), but only 4 out of 24 healthy females were within the osteoporosis range ( $p < 0.0001$ ). Among males, 7 out of 21 ALS patients had BMD values below 0.700 mg/cm<sup>2</sup>, and 23 out of 42 in the healthy group. Differences in the proportion of osteoporotic males were not statistically significant between the two groups (Fisher's exact test,  $p = 0.468$ ).

QUS bone parameters did not depend on the of the disease type (bulbar or spinal ALS) (Table 4). Although spinal ALS showed impaired Barthel index ( $p < 0.05$ ), higher fat % ( $p < 0.05$ ), less muscle % ( $p < 0.01$ ), and lower TSH levels ( $p < 0.05$ ), no statistically significant differences were found in any of the bone parameters measured (Table 4).

### Correlation Between Clinical, Metabolic, and Bone Parameters

There was no correlation between any of the clinical parameters analyzed and the bone QUS measurements, indicating that ALS clinical profile has not a direct impact on bone health in this sample. However, two laboratory test, 25-OH-Vitamin D and TSH were related with bone quality parameters. Vitamin D strongly and positively correlated with BUA (Spearman's  $r$ : 0.867,  $p = 0.002$ ), SOS ( $r$ : 0.750,  $p = 0.020$ ), SI ( $r$ : 0.783,  $p = 0.013$ ), T-score ( $r$ : 0.800,  $p = 0.010$ ), and estimated DMO ( $r$ : 0.783,  $p = 0.013$ ). TSH levels showed also a positive but less strong correlation with T-score ( $r$ : 0.470,  $p = 0.036$ ), SI ( $r$ : 0.459,

**TABLE 3 |** Bone parameters obtained by QUS in the two groups of participants.

	Healthy controls			ALS			Healthy vs ALS		
	Mean ± SD (95% CI)			Mean ± SD (95% CI)			Mann-Whitney U-test Z* (p)		
	Total (n = 66)	Males (n = 42)	Females (n = 24)	Total (n = 33)	Males (n = 21)	Females (n = 12)	Total	Males	Females
BUA (dB/MHz)	128.0 ± 12.7 (124.9–131.2)	131.6 ± 12.9 (127.5–135.6)	121.8 ± 9.9 (117.6–126.0)	113.9 ± 22.5 (105.9–121.9)	121.2 ± 21.5 (111.4–130.9)	101.2 ± 19.2 (89.1–113.5)	−3.125 (0.002)**	−1.823 (0.068)	−3.290 (0.001)**
SOS (m/s)	1560.2 ± 42.1 (1549.8–1570.6)	1566.7 ± 47.5 (1551.9–1581.5)	1548.8 ± 28.0 (1537.0–1560.7)	1539.7 ± 59.5 (1518.6–1560.8)	1559.3 ± 60.2 (1531.9–1586.8)	1505.3 ± 40.8 (1479.3–1531.3)	−2.316 (0.021)*	−0.707 (0.479)	−3.121 (0.002)**
I-stiffness	101.9 ± 18.7 (97.3–106.5)	105.9 ± 20.3 (99.6–112.3)	94.8 ± 13.2 (89.2–100.4)	86.8 ± 30.8 (75.9–97.8)	97.1 ± 30.1 (83.3–110.8)	68.9 ± 23.8 (53.7–84.0)	−2.754 (0.006)**	−1.269 (0.205)	−3.323 (0.001)**
T-score	0.3 ± 1.2 (0.0–0.6)	0.4 ± 1.4 (−0.1–0.8)	0.3 ± 0.9 (−0.1–0.6)	−1.01 ± 2.3 (−1.8 to −0.1)	−0.2 ± 2.3 (−1.2–0.8)	−2.3 ± 1.8 (−3.5 to −1.2)	−3.311 (0.001)**	−1.232 (0.218)	−3.897 (0.000)**
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.689 ± 0.136 (0.664–0.722)	0.715 ± 0.151 (0.667–0.762)	0.643 ± 0.092 (0.604–0.682)	0.599 ± 0.209 (0.525–0.673)	0.688 ± 0.207 (0.574–0.763)	0.477 ± 0.153 (0.379–0.575)	−2.501 (0.012)*	−0.962 (0.336)	−3.255 (0.001)**

\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01.

*p* = 0.042), and BUA (*r*: 0.451, *p* = 0.046). Serum calcium, ALP and T4 did not show correlation with any of the bone parameters.

### DISCUSSION

In this cross-sectional study, bone quality parameters of patients with ALS measured by QUS were compared with those of a group of healthy individuals matched in age and anthropometric variables. There were differences in bone quality parameters between the ALS and the control groups. ALS participants showed lower bone quality (lower SOS, lower BUA, lower SI, lower T-score, and lower estimated BMD) than the control group. Notably, the differences in the bone quality variables were only statistically significant in females. The ALS group was stratified into 2 subtypes (bulbar/medullary) and no significant differences were found between the subgroups.

This study, therefore, confirms the hypothesis that ALS patients may exhibit deteriorated bone health with lower bone density than healthy individuals. These structural bone changes cannot be attributed to the aging process. Interestingly, the youngest ALS patients in this series showed BMD estimated values quite similar to those found in older ALS patients, showing a lack of correlation between age and BMD as found in healthy individuals. However, the poor bone health detected in this group of ALS patients could be a consequence of changes in diet, physical inactivity, lack of sun exposure, medication use, or other unknown features linked to the disease that were not addressed in the current research.

An increased bone turnover was recently detected in ALS patients after measurement of blood biomarkers (24). Furthermore, Vitamin D deficiency that could affect bone health including bone turnover and bone mineral density was observed in ALS patients (8, 25, 26). In the current study, neither bone turnover markers nor vitamin D metabolism were measured so the relationship between deterioration of bone quality parameters and biomarkers could not be explored.

Various case-controlled studies have described an association between ALS and fracture occurrence (27, 28). Some of these studies included a mix of ALS patients and cases with progressive muscular atrophy. Recently, a prospective study showed a positive association between ALS and fracture incidence, both osteoporotic and non-osteoporotic and of both traumatic and non-traumatic origin (29). The increased incidence of fractures in ALS patients suggests poor bone health as an underlying factor in several neurodegenerative diseases (8, 25, 26, 30). None of our ALS patients reported fractures before the start of the study. As most of them exhibited poor bone quality as assessed by QUS, a prospective study regarding the occurrence of fractures in the future could be worthwhile.

Most of the experimental research on ALS uses the SOD1G93A mouse model. Interestingly, a reduction in trabecular and cortical bone mass reducing the mechanical properties of bone was found in this ALS animal model (31, 32). The bone loss was related to decreased bone formation and enhanced bone resorption. In addition to the deteriorated skeletal muscle function, these findings reflect signs of skeletal fragility in ALS animal models as indicated also by reduced femoral bending properties and fracture resistance compared to control mice (32). This latter study concluded that the loss of bone mass was due to reduced bone formation and increased resorption. Similarly, analyzing the same ALS mice model, a reduced bone mass associated with multiple impairments of osteoblast properties and striking acceleration of osteoclast formation in bone was found only in those animals with severe muscle atrophy (31).

The results of the current study on ALS patients are in agreement with previous observations on ALS animal models and, therefore, may have important repercussions for clinical practice. ALS patients have poor bone quality mediating a skeletal fragility that is still not well-understood. In addition to a deeper knowledge of the underlying mechanisms of neurodegeneration, a possible muscle-bone crosstalk in ALS is currently gaining attention among investigators (12).

**TABLE 4 |** Clinical profile, laboratory tests and bone parameters according ALS subtype.

	ALS Mean $\pm$ SD (95% CI)		Mann-Whitney Z (p)
	Bulbar (N = 11)	Spinal (N = 22)	
<b>Clinical profile</b>			
Time from diagnosis (months)	29.3 $\pm$ 20.1 (13.8–44.7)	22.0 $\pm$ 16.9 (14.5–29.4)	–1.071 (0.284)
ALSFRS-R score	36.7 $\pm$ 6.5 (31.7–41.7)	33.9 $\pm$ 9.9 (28.8–39.0)	–0.405 (0.685)
Barthel index	94.0 $\pm$ 13.4 (77.3–110.6)	68.1 $\pm$ 22.0 (54.7–81.3)	–2.265 (0.026)*
FEV%	74.4 $\pm$ 13.6 (61.7–87.0)	79.5 $\pm$ 14.7 (65.9–93.2)	–0.768 (0.442)
BMI	24.2 $\pm$ 2.4 (22.5–25.9)	24.7 $\pm$ 2.8 (23.4–25.9)	–0.569 (0.589)
Fat%	15.1 $\pm$ 3.2 (11.7–18.4)	19.4 $\pm$ 3.5 (17.4–21.3)	–2.180 (0.029)*
Muscle%	39.9 $\pm$ 2.2 (37.6–42.2)	35.6 $\pm$ 2.5 (34.2–37.1)	–2.725 (0.006)**
MRC global score	73.0 $\pm$ 7.1 (65.5–80.4)	52.3 $\pm$ 15.3 (43.8–60.8)	–2.618 (0.009)**
<b>Laboratory test</b>			
25-OH-VitD (ng/mL)	27.3 $\pm$ 6.8 (16.4–38.2)	17.4 $\pm$ 5.7 (10.4–24.5)	–1.715 (0.086)
Calcium (mg/dL)	9.5 $\pm$ 0.4 (9.0–9.9)	9.4 $\pm$ 0.2 (9.2–9.6)	–0.453 (0.662)
Alkaline phosphatase (U/L)	57.5 $\pm$ 9.6 (47.4–67.5)	67.2 $\pm$ 24.1 (53.2–81.2)	–1.279 (0.201)
T4 (ng/dL)	1.2 $\pm$ 0.2 (0.8–1.6)	2.1 $\pm$ 2.6 (0.1–4.4)	–0.570 (0.575)
TSH (uU/mL)	2.1 $\pm$ 0.4 (1.6–2.5)	1.4 $\pm$ 0.6 (1.1–1.7)	–2.144 (0.032)*
<b>Bone parameters</b>			
I-stiffness	86.8 $\pm$ 33.7 (64.1–109.5)	86.9 $\pm$ 30.1 (73.5–100.2)	–0.076 (0.939)
BUA (dB/MHz)	115.4 $\pm$ 25.1 (98.5–132.4)	113.1 $\pm$ 21.7 (103.5–122.8)	–0.229 (0.819)
SOS (m/s)	1535.3 $\pm$ 63.2 (1492.9–1577.8)	1541.8 $\pm$ 58.9 (1515.3–1568.0)	–0.496 (0.620)
T-score	–1.0 $\pm$ 2.6 (–2.7–0.7)	–1.0 $\pm$ 2.3 (–2.0–0.0)	–0.115 (0.909)
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.592 $\pm$ 0.226 (0.439–0.744)	0.602 $\pm$ 0.205 (0.511–0.693)	–0.191 (0.849)

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

At present, there is increasing evidence about the lifelong interaction of skeletal muscles and bone remodeling (33–37). Skeletal muscles offer important anabolic stimuli for bone turnover through the delivery of osteogenic growth factors, such as fibroblast growth factor (FGF-2) and insulin-like growth factor (IGF-1) (38–41). Moreover, maintaining bone homeostasis is closely related to muscle-derived stem cells (42–44). Finally, from a morphologic developmental perspective, the muscle-induced mechanical loading of bones regulates not only the shape of the

bones but also crucial aspects of bone morphogenesis (37, 40, 41, 45, 46). However, the basic molecular mechanisms behind the potential muscle-bone interactions still remain unclear.

ALS is characterized by a severe muscle atrophy that theoretically leads to gradual reduction of the mechanical loading to the skeleton and consequently to a disorder of bone remodeling and morphology that may be important as the disease progresses. Muscle paralysis in ALS patients rapidly affects the respiratory function leading to death. Therefore, bone health impairment in ALS patients and its possible involvement in disease progression have rarely been addressed in the literature. The few clinical studies on bone quality in ALS patients confirm that these patients exhibit decreased bone mineral density, elevated serum bone turnover markers and a higher fracture incidence (8, 47). The novelty of the current research is the influence of sex on bone structural properties in ALS patients, particularly in young adults. Women with ALS showed a greater bone loss than their healthy counterparts. A convincing explanation for this sex-linked bone deterioration not involving aging is unclear and deserves further research.

For clinicians, the prevention of skeletal fractures should be more extensively considered since fracture occurrence could severely impair the quality of life in longer-surviving ALS patients. Drugs inhibiting bone resorption such as bisphosphonates or Denosumab and drugs promoting bone formation such as teriparatide, should be included in the therapeutic arsenal of ALS patients. Supplementation with vitamin D should be also considered in ALS patients with Vitamin D deficiency since a delayed decline in the ALSFRS-R score was found in some studies (25, 26). In the current study, Vitamin D levels positively correlated to all the bone parameters analyzed, even with the estimated BMD. These results emphasized the monitoring of Vitamin D in ALS patients in terms of bone health preservation and fracture prevention.

This study has obviously some limitations. First, the cohort included prevalent cases with more than 6 months of symptoms that were included in a list to initiate a single-center RCT. The series did not include newly diagnosed cases. Our hospital is a reference center for ALS treatment; all new cases diagnosed in the community area are derived to our ALS unit. There are no other patients treated outside our Hospital in our health area. We honestly believe that this cohort of ALS patients represented a true population-based sample. A second limitation is related to the QUS technique that does not directly measure BMD. However, this non-invasive technique provides good estimators (BUA and SOS) of bone quality such as the microarchitecture, elasticity, and density. Furthermore, QUS is sensitive to differences in bone porosity and matrix properties between individuals (48). Independently of certain variability of data, BUA and SOS have been found valuable in predicting fracture risk (49).

In conclusion, this study confirms that ALS patients, particularly females, exhibit deteriorated bone health with lower bone density than healthy individuals. These structural bone changes are independent of the clinical status and ALS subtype, and cannot be attributed to the aging process. Bone health in ALS patients seems to be related to certain metabolic parameters

such as Vitamin D and TSH levels. Further research is required to determine the full impact of neurodegenerative diseases such as ALS on bone metabolism.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Human Research Committee of the Commission for Ethics in Experimental Research of the University of Valencia (reference number H1479983999044). The patients/participants

provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JC-L, JE, and CB designed the research. JC-L and DE recorded the data. JC-L, DE, MB, JR, JE, and CB analyzed the data, read, and approved the manuscript. All authors contributed to the writing of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This study was funded by the Valencia Catholic University San Vicente Mártir (grant 2017-216-001).

## REFERENCES

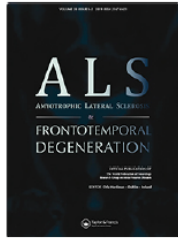
- Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol*. (2013) 9:617–28. doi: 10.1038/nrnneurol.2013.203
- Huisman MH, de Jong SW, van Doormaal PT, Weinreich SS, Schelhaas HJ, van der Kooij AJ, et al. Population based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis using capture-recapture methodology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. (2011) 82:1165–70. doi: 10.1136/jnnp.2011.244939
- Forbes RB, Colville S, Swingler RJ. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS/MND) in people aged 80 or over. *Age Ageing*. (2004) 33:131–4. doi: 10.1093/ageing/afh013
- Pradas J, Puig T, Rojas-García R, Viguera ML, Gich I, Logroscino G. Amyotrophic lateral sclerosis in Catalonia: a population based study. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. (2013) 14:278–83. doi: 10.3109/21678421.2012.749915
- Andrews JA, Meng L, Kulke SF, Rudnicki SA, Wolff AA, Bozik ME, et al. Association between decline in slow vital capacity and respiratory insufficiency, use of assisted ventilation, tracheostomy, or death in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol*. (2018) 75:58–64. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.3339
- Peters TL, Weibull CE, Fang F, Sandler DP, Lambert PC, Ye W, Kamel F. Association of fractures with the incidence of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. (2017) 18:419–25. doi: 10.1080/21678421.2017.1300287
- Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. (2017) 377:162–72. doi: 10.1056/NEJMr1603471
- Sato Y, Honda Y, Asoh T, Kikuyama M, Oizumi K. Hypovitaminosis D and decreased bone mineral density in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Neurol*. (1997) 27:225–9. doi: 10.1159/000117447
- Neel BA, Lin Y, Pessin JE. Skeletal muscle autophagy: a new metabolic regulator. *Trends Endocrinol Metab*. (2013) 24:635–43. doi: 10.1016/j.tem.2013.09.004
- Hamrick MW, McNeil PL, Patterson SL. Role of muscle-derived growth factors in bone formation. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. (2010) 10:64–70.
- Zhou J, Yi J, Bonewald L. Muscle-bone crosstalk in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Osteoporos Rep*. (2015) 13:274–9. doi: 10.1007/s11914-015-0281-0
- Koh SH, Baik W, Noh MY, Cho GW, Kim HY, Kim KS, Kim SH. The functional deficiency of bone marrow mesenchymal stromal cells in ALS patients is proportional to disease progression rate. *Exp Neurol*. (2012) 233:472–80. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.11.021
- Cho GW, Noh MY, Kim HY, Koh SH, Kim KS, Kim SH. Bone marrow-derived stromal cells from amyotrophic lateral sclerosis patients have diminished stem cell capacity. *Stem Cells Dev*. (2010) 19:1035–42. doi: 10.1089/scd.2009.0453
- Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Mot Neuron Disord*. (2000) 1:293–9. doi: 10.1080/146608200300079536
- World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. (2013) 310:2191–4. doi: 10.1001/jama.2013.281053
- Wang J, Thornton JC, Kolesnik S, Pierson RN. Anthropometry in body composition. An overview. *Ann NY Acad Sci*. (2000) 904:317–26. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06474.x
- Kollewe K, Mauss U, Krampfl K, Petri S, Dengler R, Mohammadi B. ALSFRS-R score and its ratio: a useful predictor for ALS-progression. *J Neurol Sci*. (2008) 275:69–73. doi: 10.1016/j.jns.2008.07.016
- de la Rubia JE, Drehmer E, Platero JL, Benlloch M, Caplliure-Llopis J, Villaron-Casales C, et al. Efficacy and tolerability of EH301 for amyotrophic lateral sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled human pilot study. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. (2019) 20:115–22. doi: 10.1080/21678421.2018.1536152
- Chin KY, Ima-Nirwana S. Calcaneal quantitative ultrasound as a determinant of bone health status: What properties of bone does it reflect? *Int J Med Sci*. (2013) 10:1778–83. doi: 10.7150/ijms.6765
- Trimou P, Bosaeus I, Bengtsson BA, Landin-Wilhelmsen K. High correlation between quantitative ultrasound and DXA during 7 years of follow-up. *Eur J Radiol*. (2010) 73:360–4. doi: 10.1016/j.ejrad.2008.11.024
- Xu Y, Guo B, Gong J, Xu H, Bai Z. The correlation between calcaneus stiffness index calculated by QUS and total body BMD assessed by DXA in Chinese children and adolescents. *J Bone Mineral Metab*. (2014) 32:159–66. doi: 10.1007/s00774-013-0474-5
- Damilakis J, Perisnakis K, Gourtsoyiannis N. Imaging ultrasonometry of the calcaneus: Optimum-score thresholds for the identification of osteoporotic subjects. *Calcified Tissue Int*. (2001) 68:219–24. doi: 10.1007/s002230020014
- Frost ML, Blake GM, Fogelman I. Can the WHO criteria for diagnosing osteoporosis be applied to calcaneal quantitative ultrasound? *Osteoporosis Int*. (2000) 11:321–30. doi: 10.1007/s001980070121
- Fang F, Kwee LC, Allen KD, Umbach DM, Ye W, Watson M, et al. Association between blood lead and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol*. (2010) 171:1126–33. doi: 10.1093/aje/kwq063
- Karam C, Barrett MJ, Imperato T, MacGowan DJ, Scelsa S. Vitamin D deficiency and its supplementation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Neurosci*. (2013) 20:1550–3. doi: 10.1016/j.jocn.2013.01.011
- Camu W, Tremblier B, Plassot C, Alhandry S, Salsac C, Pageot N, et al. Vitamin D confers protection to motoneurons and is a prognostic factor of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. (2014) 35:1198–205. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.005
- Cruz DC, Nelson LM, McGuire V, Longstreth WT Jr. Physical trauma and family history of neurodegenerative diseases in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Neuroepidemiology*. (1999) 18:101–10. doi: 10.1159/000069413

28. Pupillo E, Messina P, Logroscino G, Zoccollella S, Chiò A, Calvo A, et al. Trauma and amyotrophic lateral sclerosis: a case-control study from a population-based registry. *Eur J Neurol.* (2012) 19:1509–17. doi: 10.1111/j.1468-1331.2012.03723.x
29. Seals RM, Hansen J, Gredal O, Weisskopf MG. Physical trauma and amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study using Danish national registries. *Am J Epidemiol.* (2015) 183:294–301. doi: 10.1093/aje/kwv169
30. Roos PM. Osteoporosis in neurodegeneration. *J Trace Elem Med Biol.* (2014) 28:418–21. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.08.010
31. Zhu K, Yi J, Xiao Y, Lai Y, Song P, Zheng W, et al. Impaired bone homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis mice with muscle atrophy. *J Biol Chem.* (2015) 290:8081–94. doi: 10.1074/jbc.M114.603985
32. Ko FC, Li J, Brooks DJ, Rutkove SB, Boussein ML. Structural and functional properties of bone are compromised in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* (2018) 19:457–62. doi: 10.1080/21678421.2018.1452946
33. Hamrick M. JMNI special issue: basic science and mechanisms of muscle-bone interactions. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* (2010) 10:1–2.
34. Kaji H. Interaction between muscle and bone. *J Bone Metab.* (2014) 21:29–40. doi: 10.11005/jbm.2014.21.1.29
35. Lang TF. The bone-muscle relationship in men and women. *J Osteoporos.* (2011) 2011:702–35. doi: 10.4061/2011/702735
36. Lebrasseur NK, Achenbach SJ, Melton LJ, Amin S, Khosla S. Skeletal muscle mass is associated with bone geometry and microstructure and serum insulin like growth factor binding protein-2 levels in adult women and men. *J Bone Miner Res.* (2012) 27:2159–69. doi: 10.1002/jbmr.1666
37. Shackelford LC, LeBlanc AD, Driscoll TB, Evans HJ, Rianon NJ, Smith SM, et al. Resistance exercise as a countermeasure to disuse induced bone loss. *J Appl Physiol.* (2014) 97:119–29. doi: 10.1152/jappphysiol.00741.2003
38. Hamrick MW, McNeil PL, Patterson SL. Role of muscle-derived growth factors in bone formation. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* (2010) 10:64–70.
39. Kahn J, Schwartz Y, Blitz E, Krief S, Sharir A, Breitel DA, et al. Muscle contraction is necessary to maintain joint progenitor cell fate. *Dev Cell.* (2009) 16:734–43. doi: 10.1016/j.devcel.2009.04.013
40. Sharir A, Stern T, Rot C, eShahar R, Zelzer E. Muscle force regulates bone shaping for optimal load-bearing capacity during embryogenesis. *Development.* (2011) 138:3247–59. doi: 10.1242/dev.063768
41. Schwartz Y, Farkas Z, Stern T, Aszódi A, Zelzer E. Muscle contraction controls skeletal morphogenesis through regulation of chondrocyte convergent extension. *Dev Biol.* (2012) 370:154–63. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.07.026
42. Li H, Johnson NR, Usas A, Lu A, Poddar M, Wang Y, Huard J. Sustained release of bone morphogenetic protein 2 via coacervate improves the osteogenic potential of muscle-derived stem cells. *Stem Cells Transl Med.* (2013) 2:667–77. doi: 10.5966/sctm.2013-0027
43. Oishi T, Uezumi A, Kanaji A, Yamamoto N, Yamaguchi A, Yamada H, Tsuchida K. Osteogenic differentiation capacity of human skeletal muscle-derived progenitor cells. *PLoS ONE.* (2013) 8:56641. doi: 10.1371/journal.pone.0056641
44. Sun JS, Wu SY, Lin FH. The role of muscle-derived stem cells in bone tissue engineering. *Biomaterials.* (2005) 26:3953–60. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.016
45. Bikle DD, Sakata T, Halloran BP. The impact of skeletal unloading on bone formation. *Gravit Space Biol Bull.* (2003) 16:45–54.
46. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al. Mechanical stimulation of bone *in vivo* reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* (2008) 283:5866–75. doi: 10.1074/jbc.M705092200
47. Sato Y, Honda Y, Iwamoto J. Etidronate for fracture prevention in amyotrophic lateral sclerosis: a randomized controlled trial. *Bone.* (2006) 39:1080–6. doi: 10.1016/j.bone.2017.10.008
48. Grondin J, Grimal Q, Yamamoto K, Matsukawa M, Saied A, Laugier P. Relative contributions of porosity and mineralized matrix properties to the bulk axial ultrasonic wave velocity in human cortical bone. *Ultrasonics.* (2012) 52:467–71. doi: 10.1016/j.ultras.2011.11.008
49. Khaw KT, Reeve J, Luben R, Bingham S, Welch A, Wareham N. Prediction of total and hip fracture risk in men and women by quantitative ultrasound of the calcaneus: EPIC-Norfolk prospective population study. *Lancet.* (2004) 363:197–202. doi: 10.1016/S0140-6736(03)15325-1

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Caplliure-Llopis, Escrivá, Benlloch, de la Rubia Ortí, Estrela and Barrios. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 9.3 Publicación 3.



### Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration



ISSN: 2167-8421 (Print) 2167-9223 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iafd20>

## Efficacy and tolerability of EH301 for amyotrophic lateral sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled human pilot study

JosÉ E. de la Rubia, Eraci Drehmer, JosÉ L. Platero, María Benlloch, Jordi Caplliure-Llopis, Carlos Villaron-Casales, Nieves de Bernardo, Jorge Alarcón, Cristian Fuente, Sandra Carrera, David Sancho, Pilar García-Pardo, Raquel Pascual, Marta Juárez, María Cuerda-Ballester, Alfonso Forner, Sandra Sancho-Castillo, Carlos Barrios, Elena Obrador, Patricia Marchio, Rosario Salvador, Holly E. Holmes, Ryan W. Dellinger, Leonard Guarente & José M. Estrela

**To cite this article:** JosÉ E. de la Rubia, Eraci Drehmer, JosÉ L. Platero, María Benlloch, Jordi Caplliure-Llopis, Carlos Villaron-Casales, Nieves de Bernardo, Jorge Alarcón, Cristian Fuente, Sandra Carrera, David Sancho, Pilar García-Pardo, Raquel Pascual, Marta Juárez, María Cuerda-Ballester, Alfonso Forner, Sandra Sancho-Castillo, Carlos Barrios, Elena Obrador, Patricia Marchio, Rosario Salvador, Holly E. Holmes, Ryan W. Dellinger, Leonard Guarente & José M. Estrela (2019) Efficacy and tolerability of EH301 for amyotrophic lateral sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled human pilot study, *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 20:1-2, 115-122, DOI: [10.1080/21678421.2018.1536152](https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1536152)

**To link to this article:** <https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1536152>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 22 Jan 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 344



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iafd20>

## RESEARCH ARTICLE

## Efficacy and tolerability of EH301 for amyotrophic lateral sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled human pilot study

JOSÉ E. DE LA RUBIA<sup>1</sup>, ERACI DREHMER<sup>2</sup>, JOSÉ L. PLATERO<sup>1</sup>, MARÍA BENLLOCH<sup>1</sup>, JORDI CAPLLIURE-LLOPIS<sup>3</sup>, CARLOS VILLARON-CASALES<sup>4</sup>, NIEVES DE BERNARDO<sup>4</sup>, JORGE ALARCÓN<sup>4</sup>, CRISTIAN FUENTE<sup>1</sup>, SANDRA CARRERA<sup>5</sup>, DAVID SANCHO<sup>1</sup>, PILAR GARCÍA-PARDO<sup>6</sup>, RAQUEL PASCUAL<sup>7</sup>, MARTA JUÁREZ<sup>8</sup>, MARÍA CUERDA-BALLESTER<sup>1</sup>, ALFONSO FORNER<sup>1</sup>, SANDRA SANCHO-CASTILLO<sup>1</sup>, CARLOS BARRIOS<sup>9</sup>, ELENA OBRADOR<sup>10</sup>, PATRICIA MARCHIO<sup>11</sup>, ROSARIO SALVADOR<sup>10</sup>, HOLLY E. HOLMES<sup>12</sup>, RYAN W. DELLINGER<sup>12</sup>, LEONARD GUARENTE<sup>12,13</sup> AND JOSÉ M. ESTRELA<sup>10</sup>


<sup>1</sup>Department of Nursing, Catholic University San Vicente Mártir, Valencia, Spain, <sup>2</sup>Department of Health and Functional Valorization, Catholic University San Vicente Martir, Valencia, Spain, <sup>3</sup>Primary Care Service, University Hospital La Ribera, Alcira, Spain, <sup>4</sup>Department of Physiotherapy, European University of Valencia, Valencia, Spain, <sup>5</sup>Department of Health Sciences, Catholic University San Vicente Martir, Valencia, Spain, <sup>6</sup>Department of Medicine, University Jaume I, Castellón, Spain, <sup>7</sup>Rehabilitation Service, General University Hospital, Valencia, Spain, <sup>8</sup>Clínica Artes & Timefit, Valencia, Spain, <sup>9</sup>Institute for Research on Musculoskeletal Disorders, Catholic University San Vicente Mártir, Valencia, Spain, <sup>10</sup>Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain, <sup>11</sup>Virgen del Consuelo Hospital, Valencia, Spain, <sup>12</sup>Elysium Health, Inc., New York, NY, USA and <sup>13</sup>Department of Biology and Glenn Laboratories for the Science of Aging, MIT, Cambridge, MA, USA

**Abstract**

**Background:** Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease, characterized by progressive loss of spinal and cortical motor neurons, leading to muscular atrophy, respiratory failure, and ultimately death. There is no known cure, and the clinical benefit of the two drugs approved to treat ALS remains unclear. Novel disease-modifying therapeutics that are able to modulate the disease course are desperately needed. Our objective was to evaluate the efficacy and tolerability of Elysium Health's candidate drug EH301 in people with ALS (PALS). **Methods:** This was a single-center, prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. Thirty-two PALS were recruited thanks to the collaboration of the Spanish Foundation for ALS Research (FUNDELA). Study participants were randomized to receive either EH301 or placebo and underwent evaluation for 4 months. Differences between EH301 and placebo-treated participants were evaluated based on standard clinical endpoints, including the revised ALS functional rating scale (ALSF<sub>RS</sub>-R), forced vital capacity (FVC), and the Medical Research Council (MRC) grading scale. **Results:** Compared to placebo, participants treated with EH301 demonstrated significant improvements in the ALSF<sub>RS</sub>-R score, pulmonary function, muscular strength, and in skeletal muscle/fat weight ratio. EH301 was shown to significantly slow the progression of ALS relative to placebo, and even showed improvements in several key outcome measures compared with baseline. **Conclusions:** This study provides evidence in support of the disease-modifying effects of EH301 for the treatment of ALS.

**Keywords:** Amyotrophic lateral sclerosis, 1-(beta-D-Ribofuranosyl)nicotinamide chloride, 3,5-Dimethoxy-4'-hydroxy-trans-stilbene, randomized control study, human

Correspondence: Prof. José M. Estrela, Department of Physiology, Faculty of Medicine and Odontology, University of Valencia, 15 Avda. Blasco Ibañez, 46010 Valencia, Spain. Tel: +34 96 3864649. E-mail: jose.m.estrela@uv.es

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

This article has been republished with minor changes. These changes do not impact the academic content of the article.

(Received 2 July 2018; revised 24 September 2018; accepted 4 October 2018)

ISSN 2167-8421 print/ISSN 2167-9223 online © 2019 World Federation of Neurology on behalf of the Research Group on Motor Neuron Diseases  
DOI: 10.1080/21678421.2018.1536152

## Introduction

It has been nearly 150 years since Charcot and Joffroy first described the symptoms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (1); yet, we are still no closer to a curative treatment for this debilitating disease. In 1995, riluzole became the first approved treatment for ALS. However, it is only mildly efficacious and extends survival by 2–3 months (2). More recently, edaravone received FDA approval for the treatment of ALS, based on the results from a Phase III showing a difference in the 24-week change in ALSFRS-R score in the edaravone-treated group relative to placebo (–5.01 compared to –7.50, respectively) (3). However, edaravone is only beneficial to a subset of people with early-stage ALS (3). It is also costly (~\$140,000 annually in the US) and requires daily intravenous infusions over 2 weeks, followed by a 2-week drug-free period (4,5). These factors may make edaravone treatment unattainable for some people with ALS (PALS). Effective, disease-modifying treatments which serve the wider ALS community are desperately needed.

There is substantial interest in the NAD<sup>+</sup> dependent class III histone deacylases, or sirtuins, as therapeutic targets in ALS (6). Sirtuins regulate a myriad of cellular processes that are implicated in ALS, such as the regulation of energy metabolism, mitochondria function, inflammation, and DNA repair. Altered sirtuin 1 (SIRT1) levels have been observed both in mouse models of ALS (7) and postmortem tissues from ALS patients (8); therefore, techniques to increase sirtuin activity represent viable therapeutic approaches in the treatment of ALS.

In this study, we employed EH301—a combination of 1-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl) nicotinamide chloride and 3,5-Dimethoxy-4'-hydroxy-trans-stilbene—in a placebo-controlled, double-blinded, randomized pilot study of ALS patients. The two active compounds are predicted to work synergistically to increase NAD<sup>+</sup> levels and support sirtuin activity: 1-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl) nicotinamide chloride has been shown to increase circulating levels of NAD<sup>+</sup> in published human clinical trials (9), whereas 3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-trans-stilbene has been shown to directly activate SIRT1 (10,11). The objective of this study was to assess the safety, tolerability, and efficacy of EH301 in the treatment of ALS, based on standard clinical criteria.

## Materials and methods

### *Study design and eligibility*

This study was a single-center, randomized, double-blinded, placebo-controlled parallel-group pilot trial of EH301-treated versus placebo-treated

patients with ALS. This trial is listed on ClinicalTrials.gov (NCT03489200).

Eligible participants were 18 years of age or older and diagnosed with probable or definite (sporadic or familial) ALS by El Escorial criteria (12), with an onset of symptomatology for more than 6 months. The study recruited both female and male participants; females were not lactating, had a negative pregnancy test and agreed to use an effective method of birth control throughout the duration of the study. All patients received riluzole treatment according to standard dosage. The exclusion criteria can be found in the [Supplementary Methodology](#).

This study was approved by the University of Valencia Institutional Review Board on Human Studies (ref. H1479983999044) and participants provided written informed consent. All the procedures followed the declaration of Helsinki.

### *Randomization and blinding*

Patients were recruited thanks to the Spanish Foundation for ALS Research (FUNDELA). We randomly allocated participants in a 1:1 ratio to receive 1200mg EH301 or placebo (capsules containing brown sugar; matched in size and color). Study product was provided by Elysium Health. Half of the study drug was administered in the morning and the other half in the afternoon. Randomization was stratified by age, duration of symptoms and baseline ALSFRS-R score. The study was double-blinded, including patients and the health staff, except for the directors (J.E.R., J.M.E.). Both directors were responsible for screening, enrollment, and randomization of the study participants. Neither director collected nor analyzed data prior to un-blinding. All evaluators who collected outcome data were blinded to the treatment status of the study participants. The corresponding author was fully responsible for the strict compliance with these conditions during the months the trial lasted to avoid the possibility of bias.

### *Diet*

All patients were recommended a Mediterranean style diet (approx. 2300 kcal/day; 55% carbohydrates +30% fat +15% proteins) (see e.g. (13)). Carbohydrates in the diet corresponded to slow-release carbohydrate foods. Vitamins and oligoelements in the diet of both groups were adjusted following recommended dietary allowance by the EFSA (European Food Safety Authority).

### *Follow-up, outcomes, and data collection*

Following baseline evaluation, study participants were evaluated following 2 and 4 months of treatment. The primary outcome measurement was the ALSFRS-R score (14). Secondary outcome

measurements included pulmonary function measured using FVC, muscular strength using a modified 11-step MRC grading scale (see [Supplementary methodology](#)), BMI, fat and skeletal weight according to standard procedures (15), and electrical activity of skeletal muscles, measured using surface electromyogram (EMG). FVC was measured using a Datospir touch spirometer (Sibelmed, Barcelona, Spain) (16), and expressed as the % of the standard value that corresponds to human adults depending on sex, weight and age parameters (17). Muscle groups evaluated using surface electromyogram (EMG) were identical to those evaluated using the MRC grading scale; these include the R and L biceps, triceps, quadriceps and tibial muscles. A surface EMG measuring device (BTS FreeEMG 300, BTS S.p.A., Milan, Italy) was used to evaluate EMG signals per muscle, which were subsequently analyzed by the root mean square (RMS) method which reflects the physiological activity in the motor unit during contraction. The RMS represents the square root of the average power of the EMG signal for a given period of time (18).

Throughout the entire duration of the study, the patients had permanent communication with the medical team. Data were collected at clinical facilities dependent on the Catholic University San Vicente Mártir (Valencia, Spain). After the study concluded at 4 months, it was un-blinded and significant differences were confirmed. All study participants had the option to continue taking EH301 on an open-label extension.

#### Statistical analysis

Within-group (2- and 4-month changes relative to baseline) and between-group (2- and 4-month measurements in EH301 relative to placebo) differences were identified using a *t*-test. Data are presented as mean values  $\pm$  standard deviation for the number of different experiments.

## Results

### Participant demographics

Thirty-two PALS fulfilling the inclusion criteria were recruited between October 2016 and January 2017 and randomly distributed in two groups of 17 (placebo) and 15 (EH301) patients. Participants in both groups were similar in age, duration of symptoms, BMI, and anthropometric measurements (fat weight and skeletal muscle weight), as well as ALSFRS-R score and FVC ([Table 1](#)). Although every effort was made to randomize the patients fairly into the EH301 and placebo groups, the small size of this pilot study, coupled with the inherent heterogeneity of the disease, meant that some small differences in the

baseline measurements were found. We observed a significant difference in baseline MRC grading scale index and surface EMG measurements taken within the right tibial muscles; in both instances, the mean baseline value was lower in the EH301 group. Participants randomized into the EH301 group also had a shorter duration of symptoms ( $\Delta = 3.4$  months) and a slightly lower ALSFRS-R score ( $\Delta = 2.7$ ) at baseline; however, these differences were not significant. These differences must be taken into account when interpreting the data, as these outcome measures could be influenced by faster-progressing patients. Nevertheless, although it is a possibility, it cannot be predicted if a specific patient is going to progress faster than another.

The study began in February 2017, once participant eligibility was confirmed. A total of 12 patients withdrew from the study (7 placebo, 5 EH301); the reasons are described in [Figure 1](#). The study concluded in June 2017, following 4 months of observation.

### Primary outcome measurement

We observed a significant improvement ( $p < 0.01$ ) in the ALSFRS-R in participants treated with EH301 relative to placebo following 4 months of treatment ([Table 1](#)). At this time-point, participants within the placebo group had deteriorated significantly relative to their baseline measurements ( $p < 0.05$ ), whereas the EH301 group showed no significant decline. When comparing the change from baseline between EH301 and placebo, a significant improvement ( $p < 0.01$ ) was observed in the EH301 group at the 2- and 4-month evaluation ([Figure 2\(A-i\)](#)). This corresponded to a 3.4- and 2.5-point improvement in the EH301 group at 2 and 4 months respectively, compared to a 3.0- and 5.5-point decline in the placebo group.

### Secondary outcome measurements

We observed a significant slowing or reversal associated with treatment with EH301 in other outcome measurements. At 2 months, participants in the EH301 group showed a significant improvement ( $p < 0.01$ ) in the MRC grading scale index relative to placebo ([Table 1](#)) despite the baseline MRC grading scale index being lower at baseline in the EH301 group. This corresponded to a 9.6 ( $\pm 3.2$ ) improvement in the EH301 group, compared to a 10.0 ( $\pm 2.9$ ) decline in the placebo group ([Figure 2\(A-iii\)](#)). This observation was upheld at 4 months, resulting in a difference of 23.2 between EH301- and placebo-treated participants ( $p < 0.01$ ) ([Figure 2\(A-iii\)](#)).

We observed a significant improvement in measured forced vital capacity (FVC) at 2 months

Table 1. Baseline characteristics and change in outcome measures following 2 months (2M) and 4 months (4M) of treatment with either placebo or EH301.

	Placebo			EH301		
	BL n = 14	2M n = 14	4M n = 10	BL n = 13	2M n = 13	4M n = 10
<b>Baseline characteristics</b>						
Age (years)	55.6 (10.5)			56.9 (9.1)		
Sex (Male/Female)	8/6			9/4		
Duration of symptoms (months)	24.0 (9.6)			20.6 (12.5)		
Onset: Spinal/bulbar	10/4			10/3		
Riluzole use	14/14			13/13		
<b>Primary outcome measurement</b>						
ALSFRS-R	41.5 (5.2)	38.5 (6.0)	35.2 (3.1)*	38.8 (4.9)	42.4 (4.7)	41.3 (2.8) ++
<b>Secondary outcome measurement</b>						
FVC (%)	92.3 (12.6)	88.5 (9.7)	77.8 (10.0)**	95.3 (7.4)	101.4 (4.5)*++	97.2 (7.4) ++
MRC scale index	45.5 (3.3)	35.6 (4.4)**	34.2 (6.6)**	40.6 (2.9) —	50.1 (2.7)**++	57.4 (14.6)**++
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.6 (2.1)	23.8 (1.9)	22.3 (2.4)*	24.7 (3.7)	23.5 (2.3)	24.0 (2.0)
Fat weight (kg)	12.5 (3.8)	13.6 (4.5)	13.9 (4.0)	14.7 (3.6)	13.3 (3.7)	13.0 (4.2)
Skeletal muscle weight (kg)	26.3 (2.2)	25.8 (2.7)	25.0 (2.9)	24.4 (4.0)	24.8 (2.2)	24.9 (2.0)
<b>Surface EMG (µV)</b>						
Biceps	R	233 (87)	201 (56)	184 (46)	285 (103)	292 (87) ++
	L	245 (91)	246 (101)	190 (38)	264 (85)	288 (109)
Triceps	R	184 (53)	134 (71)*	126 (51)**	170 (66)	195 (74) +
	L	211 (77)	177 (65)	155 (45)	234 (59)	250 (71) +
Quadriceps	R	151 (46)	136 (44)	141 (35)	133 (36)	147 (75)
	L	177 (65)	146 (68)	133 (47)	138 (55)	148 (69)
Tibial	R	167 (49)	135 (53)	125 (42)	101 (57) —	97 (50)
	L	139 (50)	116 (55)	94 (33)	122 (57)	123 (68)

Data are presented as the mean (SD) and are representative of patients that completed the follow-up assessments. ALSFRS-R: amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale—revised; BMI: body mass index; EMG: electromyography; FVC: forced vital capacity; MRC: Medical Research Council Grading Scale. Statistical analyses were performed using a *t*-test. --*p* < 0.01: comparison of baseline characteristics between participants randomized to EH301 versus baseline; \**p* < 0.05, and \*\**p* < 0.01: comparison of 2M or 4M measurements versus baseline (within-group differences); +*p* < 0.05 and ++*p* < 0.01: comparison of EH301 versus placebo-treated ALS patients (between-group differences).

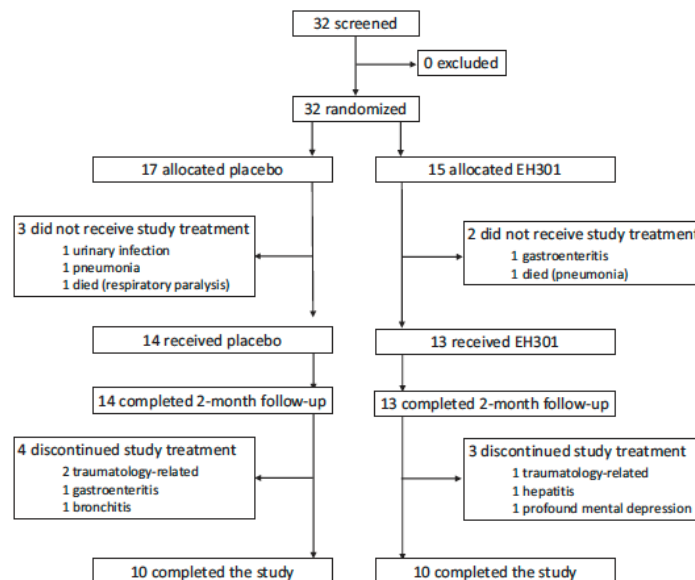


Figure 1. Study flow diagram.

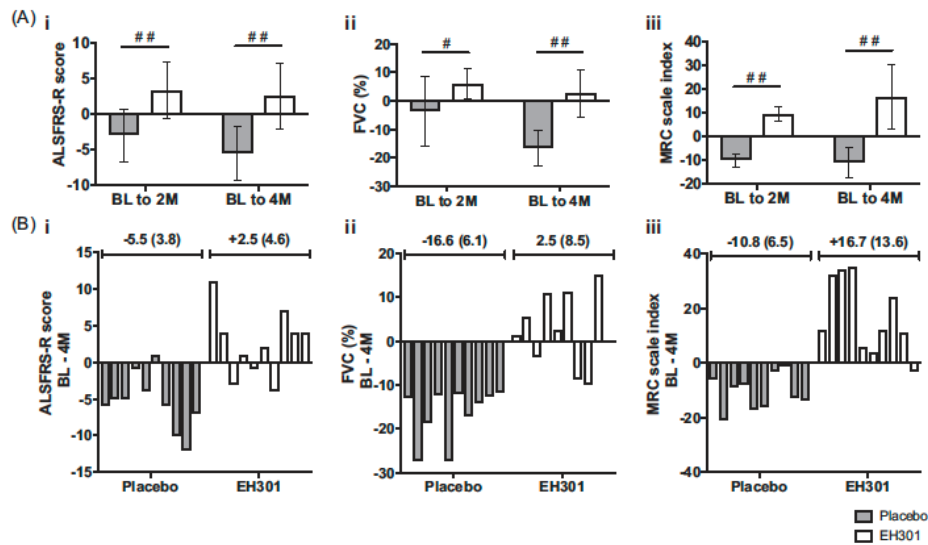


Figure 2. Main clinical endpoints. (A) 2-month (2M) and 4-month (4M) mean change from baseline (BL) in outcome measures in ALS participants treated with either placebo or EH301. Data are representative of patients that completed the follow-up assessments. Error bars represent the SD. ALSFRS-R= Revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale; MRC = Medical Research Council grading scale; FVC= forced vital capacity. Statistical analyses were performed using a *t*-test. # $p < 0.05$ , and ## $p < 0.01$ : comparison of the 2M or 4M change from baseline in EH301 vs. placebo. (B) Summary of individual study participant's 4-month change from baseline. All participants enrolled in the trial exhibited a positive response in at least one of the outcome measurements.

within the EH301 group relative to baseline ( $p < 0.05$ ) and placebo ( $p < 0.01$ ) (Table 1). At this time-point, we detected a 6.1% ( $\pm 5.3$ ) increase in FVC in the EH301 group relative to baseline, compared to a 3.8% ( $\pm 12.1$ ) decline in placebo (Table 1). At 4 months, these alterations manifested as a 19.4% difference between EH301 and placebo (Figure 2(A-ii)).

Evaluation of muscle groups using surface EMG revealed a significant increase in electrical activity within the right (R) and left (L) tibial muscles in the EH301 group at 4 months, relative to baseline ( $p < 0.01$  for both R and L) (Table 1). We also observed greater electrical activity in the L biceps, R and L triceps, and L tibial muscles (all  $p < 0.01$ ) in the EH301 group at 4 months, relative to the placebo group (Table 1). When we further explored the 2- and 4-month change from baseline across all the muscle groups, we observed an increase in the 2-month change in electrical activity in the EH301 group in 5 of the 8 muscle groups under investigation (Figure 3). The 4-month evaluation revealed a significant difference in the change from baseline between the EH301 and placebo groups within the R and L triceps and R and L tibial (all  $p < 0.01$ , respectively) (Figure 3).

Individual response data comparing 4-month data to baseline for three main clinical endpoints (MRC grading scale, FVC, and ALSFRS-R) are presented in Figure 2(b). Progression of ALS was observed in everyone within the placebo group across all clinical endpoints (with the exception of

one participant's ALSFRS-R score, which improved by 1 point). Interestingly, the entire EH301 group showed an improvement in at least one clinical endpoint. Specifically, 7 of 10 participants in the EH301 group showed improvement in ALSFRS-R scores (Figure 2(b-i)). Similarly, 6 out of 10 participants in the EH301 group showed improvement in FVC (Figure 2(B-ii)), whereas 9 out of 10 participants showed improvements in muscle strength as measured by the MRC grading scale (Figure 2(B-iii)). Only 1 participant in the EH301 group failed to show improvement in at least two of the clinical endpoints; this individual still showed significant improvement in the MRC grading scale (Figure 2(B-iii)).

Finally, we noted that treatment with EH301 induced a significant decrease in fat and a significant increase in skeletal muscle weights, effects opposite to the placebo group at both 2- and 4-months (Table 1 and Supplementary Figure S1). These anthropometric observations support the findings from the main clinical outcomes, indicating that the PALS within the EH301 group were gaining muscular strength.

After this study concluded in June 2017, all participants were given the option to continue treatment on an open-label extension study. All study participants elected to continue taking EH301. In February 2018, we completed a 1-year evaluation of participants initially randomized to EH301; the outcome measurements are presented in the supplementary material (Supplementary Table S1). Relative to baseline, we did not observe any

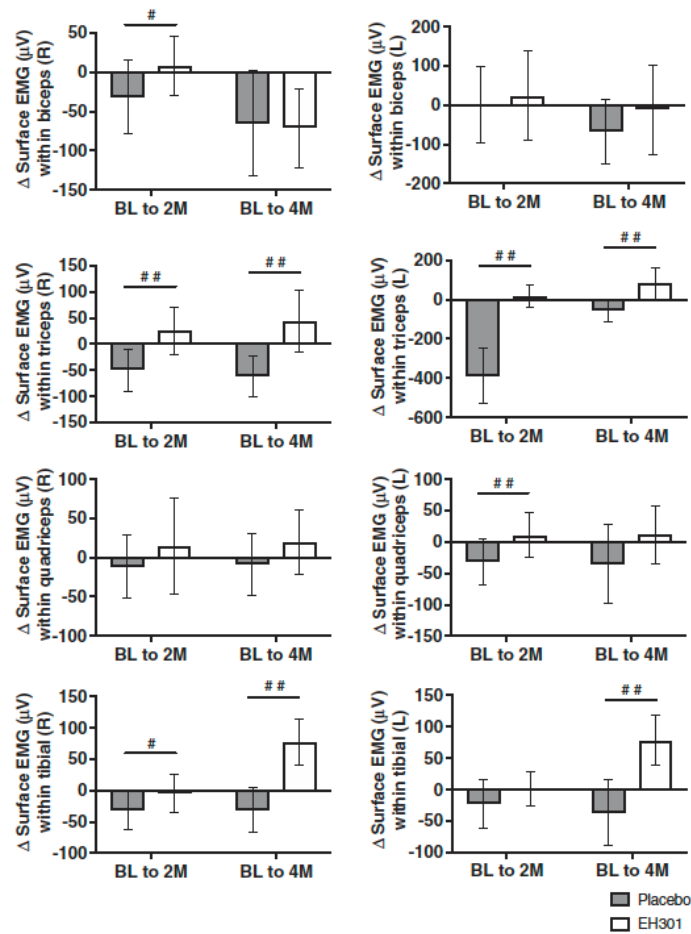


Figure 3. Changes in electromyography (EMG) graphed according to muscle (biceps, triceps, quadriceps, tibial). 2-month (2M) and 4-month (4M) mean change from baseline (BL) in outcome measures in ALS participants treated with either placebo or EH301. Data are representative of patients that completed the follow-up assessments. Error bars represent the SD. Statistical analyses were performed using a *t*-test. #*p* < 0.05, and ##*p* < 0.01: comparison of the 2M or 4M change from baseline in EH301 vs. placebo.

significant deterioration in the ALSFRS-R score or muscle function, measured using the MRC grading scale. In addition, 6 of the 8 muscle groups investigated using EMG did not show deterioration. We did, however, detect an 11.5% reduction in FVC, suggesting some decline in pulmonary function between baseline and 1 year. However, this reduction in FVC at 1-year is still less than the reduction in FVC observed in the placebo group at 4 months (11.5% mean reduction vs. 16.7%).

*Safety and tolerability*

Adverse events (AEs; including mild headache, moderate dyspepsia, and moderate diarrhea) were reported by four participants in the placebo group and five participants of the EH301 group that completed the study. All AEs were short in duration with full recovery of the participant, and none could

be attributed to the investigational product. No other serious AEs were reported during this study (with the exception of those that caused patient withdrawal; see Figure 1). None of the reasons for patient withdrawal could be directly attributed to the treatment (EH301 or placebo).

This exploratory trial has been subject to a mock FDA Biometrics Monitoring audit by PAREXEL International, Inc. using the international standards for human clinical trials as a framework. In this audit, PAREXEL concluded that this study was conducted ethically, morally, and in a controlled manner, and the outputs lend credence to the efficacy and safety of EH301 in the treatment of ALS.

**Discussion**

The results presented here demonstrate that EH301 is safe. Our preliminary results show its

positive effect against ALS progression and provide support for a larger study to formally test treatment efficacy. All participants treated with EH301 demonstrated improvement in at least one outcome measure, with the majority of participants showing improvement in at least two clinical measures.

It is important to note that all study participants were taking riluzole. This is not uncommon in clinical trials of ALS; recently published clinical trials have reported riluzole use in the range of 73% (18) to 91% (3). In this study, with 100% reported riluzole use in both groups, all observed clinical benefits should be attributed to EH301.

None of the participants were taking edaravone, which has previously shown to lessen the 6-month decline in the ALSFRS-R score by 33% after 24 weeks of treatment (3). In contrast, EH301 demonstrated significant improvements in pulmonary function and muscle strength while showing no significant decline in the ALSFRS-R score over the 4-month controlled trial.

The 1-year evaluation of EH301 provides further support despite the absence of a placebo group. We observed no further decline in the ALSFRS-R score or the MRC grading scale index relative to baseline (Supplementary Table S1). In contrast, a prospective study of progression in PALS reported a significant decline in both of these outcome measures following 12 months of observation (19). Indeed, the ALSFRS-R score is known to reliably decline by approximately 1 point/month ( $0.92 \pm 0.08$  (SEM) according to the NEALS database (20)); meanwhile, our findings of no significant difference relative to baseline imply that we may have minimized further deterioration of functionality.

We observed a significant decline in pulmonary function in the 1-year evaluation relative to baseline; however, the 11.5% decline in FVC was smaller than what we observed in the placebo group at 4 months (Supplementary Table S1 compared to Figure 2(A-ii)), in addition to estimates of predicted decline, which anticipate a decrease in FVC of ~25% over 1 year (21). We also noted that one study participant within the EH301 group exhibited a 49% decline in FVC at the 1-year evaluation relative to baseline (individual data not shown), which is reflected in the 1-year mean FVC measurement. Nevertheless, the small sample size of our study is insufficient to achieve definitive results, and further investigation is necessary.

Both components of EH301 activate sirtuins; NAD<sup>+</sup> dependent deacylases that play important roles in mitochondrial function (22). Recent studies have shown that mitochondrial deficiencies may play unexpected roles in diseases not thought to be related to these organelles. For example, genetic defects in DNA repair lead to cancer

syndromes and also trigger mitochondrial defects via NAD<sup>+</sup> depletion, due to activation of the NAD<sup>+</sup> consuming enzymes, poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP1) and PARP2 (23). This, in turn, inactivates SIRT1, resulting in a break-down in mitophagy, yielding defective mitochondria that produce excessive levels of reactive oxygen species (ROS) at the expense of ATP (24). In addition, the inappropriate activation of sterile alpha and TIR motif-constraining 1 (SARM1) may cause a depletion of NAD<sup>+</sup> and axon destruction in motor neurons (25). Hypothetically NAD<sup>+</sup> and ATP deficiencies, if occurring in ALS motor neurons, could lead to mitochondrial decline and excessive production of ROS.

In the ALS patients, we suggest that the combination treatment of EH301 may exert beneficial effects on mitochondria, including increased ATP production due to 1-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl) nicotinamide chloride and decreased ROS due to the SIRT1-activation activity of 3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-trans-stilbene (11). Moreover, 1-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl) nicotinamide chloride-induced activation of SIRT 1 and SIRT3 could lead to deacetylation and activation of mitochondrial superoxide dismutase (26), and deacetylation and upregulation of PGC-1 $\alpha$  (a master regulator of mitochondrial function and known neuroprotective factor) (27), thus, contributing to the prevention of ROS-mediated damage in the motor neurons.

3,5-Dimethoxy-4'-hydroxy-trans-stilbene can cross the BBB (28) and has been shown to increase nuclear Nrf2 (29,30); a redox-sensitive transcription factor involved in transcriptional regulation of many antioxidant genes, including  $\gamma$ -glutamyl-cysteine ligase, the rate-limiting step in glutathione (GSH) synthesis (31). It is noteworthy that maintenance of the mitochondrial GSH pool is essential to protect neurons from oxidative and nitrosative stress (32).

This pilot study indicates that EH301 may offer disease-modifying benefits for the treatment of ALS. The findings from this pilot trial must be further validated in a larger Phase II trial, to explore the efficacy of EH301 in a larger patient population.

#### Declaration of interest

The authors report no disclosures relevant to the manuscript with the exception of L. Guarente, H. E. Holmes and R.W. Dellinger who report salary support and stock options from Elysium Health, Inc.

#### Funding

Study Funded by the Catholic University San Vicente Mártir [grant 2017-216-001] and the

University of Valencia [grant OTR2017-18255INVES] (Valencia, Spain). Elysium Health, Inc., NY (USA), provided the compounds tested in this study.

## References

- Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive: avec lesions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Norm Pathol.* 1869;2.
- Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;1:CD001447.
- Abe K, Aoki M, Tsuji S, Itoyama Y, Sobue G, Togo M, et al. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2017;16:505–12.
- FDA Approves Edaravone for Treatment of ALS | ALZFORUM; 2017. Available at: <https://www.alzforum.org/news/research-news/fda-approves-edaravone-treatment-als> Accessed September 18, 2018.
- Yeo CJJ, Simmons Z. Discussing edaravone with the ALS patient: an ethical framework from a U.S. perspective. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2018;19:167–72.
- Tang BL. Could sirtuin activities modify ALS onset and progression? *Cell Mol Neurobiol.* 2017;37:1147–60.
- Han S, Choi J-R, Soon Shin K, Kang SJ. Resveratrol upregulated heat shock proteins and extended the survival of G93A-SOD1 mice. *Brain Res.* 2012;1483:112–7.
- Körner S, Bösel S, Thau N, Rath KJ, Dengler R, Petri S. Differential sirtuin expression patterns in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) postmortem tissue: neuroprotective or neurotoxic properties of sirtuins in ALS? *Neurodegener Dis.* 2013;11:141–52.
- Dellinger RW, Santos SR, Morris M, Evans M, Alminana D, Guarente L, Marcotulli E. Repeat dose NRPT (nicotinamide riboside and pterostilbene) increases NAD<sup>+</sup> levels in humans safely and sustainably: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *NPJ Aging Mech Dis.* 2017;3:17.
- Guo Y, Zhang L, Li F, Hu C-P, Zhang Z. Restoration of sirt1 function by pterostilbene attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol.* 2016;776:26–33.
- Cheng Y, Di S, Fan C, Cai L, Gao C, Jiang P, et al. SIRT1 activation by pterostilbene attenuates the skeletal muscle oxidative stress injury and mitochondrial dysfunction induced by ischemia reperfusion injury. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* 2016;21:905–16.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Mot Neuron Disord.* 2000;1:293–9.
- Davis C, Bryan J, Hodgson J, Murphy K. Definition of the Mediterranean Diet: a literature review. *Nutrients.* 2015;7:9139–53.
- Kollewe K, Mauss U, Krampfl K, Petri S, Dengler R, Mohammadi B. ALSFRS-R score and its ratio: a useful predictor for ALS-progression. *J Neurol Sci.* 2008;275:69–73.
- Wang J, Thornton JC, Kolesnik S, Pierson RN. Anthropometry in body composition. An overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;904:317–26.
- Czaplinski A, Yen AA, Appel SH. Forced vital capacity (FVC) as an indicator of survival and disease progression in an ALS clinic population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;77:390–2.
- García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, Del Campo F, Galdiz JB, Giner J. Spirometry. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch Bronconeumol.* 2013;49:388–401.
- Cudkowicz ME, Titus S, Kearney M, Yu H, Sherman A, Schoenfeld D, Hayden D. Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2014;13:1083–91.
- de Carvalho M, Scotto M, Lopes A, Swash M. Quantitating progression in ALS. *Neurology.* 2005;64:1783–5.
- Castrillo-Viguera C, Grasso DL, Simpson E, Shefner J, Cudkowicz ME. Clinical significance in the change of decline in ALSFRS-R. *Amyotroph Lateral Scler.* 2010;11:178–80.
- Pinto S, de Carvalho M. Correlation between forced vital capacity and slow vital capacity for the assessment of respiratory involvement in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2017;18:86–91.
- Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev.* 2013;27:2072–85.
- Bai P, Cantó C. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. *Cell Metab.* 2012;16:290–5.
- Fang EF, et al. NAD<sup>+</sup> replenishment improves lifespan and healthspan in ataxia telangiectasia models via mitophagy and DNA repair. *Cell Metab.* 2016;24:566–81.
- Gerdts J, Brace EJ, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J. SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD<sup>+</sup> destruction. *Science.* 2015;348:453–7.
- Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab.* 2010;12:662–7.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature.* 2005;434:113–8.
- Azzolini M, La Spina M, Mattarei A, Paradisi C, Zoratti M, Biasutto L. Pharmacokinetics and tissue distribution of pterostilbene in the rat. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58:2122–32.
- Benlloch M, Obrador E, Valles SL, Rodriguez ML, Sirerol JA, Alcácer J. Pterostilbene decreases the antioxidant defenses of aggressive cancer cells in vivo: a physiological glucocorticoids- and Nrf2-dependent mechanism. *Antioxid Redox Signal.* 2016;24:974–90.
- Wang B, Liu H, Yue L, Li X, Zhao L, Yang X, Wang X. Neuroprotective effects of pterostilbene against oxidative stress injury: Involvement of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway. *Brain Res.* 2016;1643:70–9.
- Satoh T, McKercher SR, Lipton SA. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:645–57.
- Wilkins HM, Kirchoff D, Manning E, Joseph JW, Linseman DA. Mitochondrial glutathione transport is a key determinant of neuronal susceptibility to oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem.* 2013;288:5091–101.



10

**Capítulos de libro en  
congresos.**



# 10 Capítulos de libro en congresos.

## 10.1 Capítulo de libro 1.



## 10.2 Capítulo de libro 2.



### CERTIFICADO DE CARÁCTER CIENTÍFICO Y AUTORÍA DE CAPÍTULO DE LIBRO

Dr. JOSÉ JESÚS GÁZQUEZ LINARES, Catedrático de Universidad. Grupo de Investigación SEJ-473 "Intervención Psicológica y Médica a lo largo del Ciclo Vital" de la Universidad de Almería y perteneciente al Plan Andaluz de Investigación de la Consejería de Conocimiento, Investigación y Universidad de la Junta de Andalucía, Editor del Libro "Investigación en Salud y Envejecimiento: Nuevos retos de las sociedades actuales"

CERTIFICA, que:

SANDRA SANCHO CASTILLO (45800175E)  
JOSÉ LUIS PLATERO ARMERO (73662657M)  
JULIA CASANÍ CUBEL (21003366L)  
JORDI CAPLLIURE LLOPIS (73776071Y)  
MARÍA CUERDA BALLESTER (44886060L)  
MIRIAM MACÍAS LÓPEZ (35597199F)  
JOSÉ ENRIQUE DE LA RUBIA ORTI (44851052V)

son autores/as del capítulo número 35 (pp. 283-289), denominado **PERFIL HEMATOLÓGICO DEL PACIENTE CON ENFERMEDAD LATERAL AMIOTRÓFICA** publicado en el libro titulado **INVESTIGACIÓN EN SALUD Y ENVEJECIMIENTO: NUEVOS RETOS DE LAS SOCIEDADES ACTUALES**, editado por ASUNIVEP con número de ISBN: 978-84-09-23644-2, Depósito Legal: AL 2160-2020, y fecha de edición 28/09/2020.

**El carácter Científico** de este Capítulo de Libro redactado por los autores mencionados anteriormente, viene avalado por los siguientes indicadores académicos, y técnicos:

1. El presente libro: **INVESTIGACIÓN EN SALUD Y ENVEJECIMIENTO: NUEVOS RETOS DE LAS SOCIEDADES ACTUALES** ha sido compilado por profesores de la Universidad de Almería.
2. Los Capítulos que aparecen en el Libro, han seguido un riguroso proceso de **REVISIÓN (A TRAVÉS DEL PROGRAMA INFORMÁTICO ANTI-PLAGIO "IAuthenticate")**, constatando que **NO** han sido Copiados, NI plagiados, y cumplen con los requisitos de un trabajo científico.
3. El Libro está indexado en distintas Bases de Datos científicas, como Dialnet (<http://dialnet.unirioja.es>).
4. El Libro ha sido Editado por ASUNIVEP (EDITORIAL DE PRESTIGIO INDEXADA EN EL **SPI-SCHOLARLY PUBLISHERS INDICATORS**), con número de ISBN: 978-84-09-23644-2, Depósito Legal: AL 2160-2020, y fecha de edición 28/09/2020.
5. El Libro ha sido revisado por un comité editorial, formado por especialistas Doctores en distintas áreas (Enfermería, Fisioterapia, Medicina, Psicología, etc.) que han constatado el valor científico y profesional de cada publicación realizada.
6. El Libro está publicado en formato impreso, cuenta con un número elevado de ejemplares y es distribuido en varios puntos de venta a nivel nacional y diferentes Universidades españolas, como por ejemplo la Universidad de La Rioja y la Universidad de Almería.
7. La difusión de la publicación ha sido de carácter nacional e Internacional, y se puede acceder al índice de contenidos en: [https://ciise.es/7/contenido/textos/descargar\\_libro/542](https://ciise.es/7/contenido/textos/descargar_libro/542)

Y para que conste, firma el presente en Almería a 28 de septiembre de 2020



Fdo: Dr. José Jesús Gázquez Linares  
Grupo de Investigación SEJ-473  
Universidad de Almería

## 10.3 Capítulo de libro 3.



### CERTIFICADO DE CARÁCTER CIENTÍFICO Y AUTORÍA DE CAPÍTULO DE LIBRO

Dr. JOSÉ JESÚS GÁZQUEZ LINARES, Catedrático de Universidad. Grupo de Investigación SEJ-473 "Intervención Psicológica y Médica a lo largo del Ciclo Vital" de la Universidad de Almería y perteneciente al Plan Andaluz de Investigación de la Consejería de Conocimiento, Investigación y Universidad de la Junta de Andalucía, Editor del Libro "*Investigación en Salud y Envejecimiento: Nuevos retos de las sociedades actuales*"

CERTIFICA, que:

JOSÉ LUIS PLATERO ARMERO (73662657M)  
SANDRA SANCHO CASTILLO (45800175E)  
JORDI CAPLLIURE LLOPIS (73776071Y)  
MARÍA CUERDA BALLESTER (44886060L)  
MIRIAM MACÍAS LÓPEZ (35597199F)  
JULIA CASANÍ CUBEL (21003366L)  
JOSÉ ENRIQUE DE LA RUBIA ORTI (44851052V)

son autores/as del capítulo número 33 (pp. 269-276), denominado **DETERMINACIÓN DE ALSFRS-R EN ENFERMOS DE ELA** publicado en el libro titulado **INVESTIGACIÓN EN SALUD Y ENVEJECIMIENTO: NUEVOS RETOS DE LAS SOCIEDADES ACTUALES**, editado por ASUNIVEP con número de ISBN: 978-84-09-23644-2, Depósito Legal: AL 2160-2020, y fecha de edición 28/09/2020.

El carácter Científico de este Capítulo de Libro redactado por los autores mencionados anteriormente, viene avalado por los siguientes indicadores académicos, y técnicos:

1. El presente libro: **INVESTIGACIÓN EN SALUD Y ENVEJECIMIENTO: NUEVOS RETOS DE LAS SOCIEDADES ACTUALES** ha sido Compilado por profesores de la Universidad de Almería.
2. Los Capítulos que aparecen en el Libro, han seguido un riguroso proceso de REVISIÓN (A TRAVÉS DEL PROGRAMA INFORMÁTICO ANTI-PLAGIO "I'THENTICATE"), constatando que NO han sido Copiados, NI plagiados, y cumplen con los requisitos de un trabajo científico.
3. El Libro está indexado en distintas Bases de Datos científicas, como Dialnet (<http://dialnet.unirioja.es>).
4. El Libro ha sido Editado por ASUNIVEP (EDITORIAL DE PRESTIGIO INDEXADA EN EL **SPI-SCHOLARLY PUBLISHERS INDICATORS**), con número de ISBN: 978-84-09-23644-2, Depósito Legal: AL 2160-2020, y fecha de edición 28/09/2020.
5. El Libro ha sido revisado por un comité editorial, formado por especialistas Doctores en distintas áreas (Enfermería, Fisioterapia, Medicina, Psicología, etc.) que han constatado el valor científico y profesional de cada publicación realizada.
6. El Libro está publicado en formato impreso, cuenta con un número elevado de ejemplares y es distribuido en varios puntos de venta a nivel nacional y diferentes Universidades españolas, como por ejemplo la Universidad de La Rioja y la Universidad de Almería.
7. La difusión de la publicación ha sido de carácter nacional e Internacional, y se puede acceder al índice de contenidos en: [https://ciise.es/7/contenido/textos/descargar\\_libro/541](https://ciise.es/7/contenido/textos/descargar_libro/541)

Y para que conste, firma el presente en Almería a 28 de septiembre de 2020



Fdo: Dr. José Jesús Gázquez Linares  
Grupo de Investigación SEJ-473  
Universidad de Almería

11

# Comunicaciones en congresos.



# 11 Comunicaciones en congresos.

## 11.1 Comunicación 1.



### CERTIFICADO

A favor de:

*JOSÉ LUIS PLATERO ARMERO; ALFONSO FORNER JULIÁ; CRISTIAN FUENTE HERRAIZ; JORDI CAPLLIURE LLOPIS; MARIA CUERDA BALLESTER; IVAN HU YANG; JOSÉ ENRIQUE DE LA RUBIA ORTÍ*

*Por su contribución en la modalidad de COMUNICACIÓN ORAL en el "IV CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y ENVEJECIMIENTO & II CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD", con el título:*

**ANTIOXIDANTES COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA TRATAR LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)**

Además, dicha aportación está PUBLICADA en el libro de Actas del IV Congreso Internacional de Investigación en Salud. Volumen I. Con ISBN: 978-84-697-3770-5 y Depósito Legal: 1021-2017.

Dicho congreso se ha celebrado durante los días 29 y 30 de junio de 2017 en Murcia, organizado por el Grupo de Investigación SEJ-473 de la Universidad de Almería, Asociación Universitaria de Educación y Psicología, y Association University of Scientific Formation Psychology and Education Research (CINFOPER). Dicha actividad cuenta con la Resolución Favorable de Reconocimiento de Interés Científico-Sanitario concedida por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (Ref.: 2016/RIS/BG-mja) y por la Consejería de Sanidad de la Región de Murcia (Ref.: J8/2017). Del mismo modo, el Congreso ha sido acreditado con 0,3 Créditos (Ref. P-17-17034-01) por parte del Sistema de Acreditación de la Comisión Nacional de Formación (CFC - Comisión de Formación Continuada del Ministerio de Sanidad).

Murcia, a 30 de junio de 2017

Presidente del Congreso

Fdo.: D. José Jesús Gázquez Linares



