



Departamento de
Histología y Embriología



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Alteraciones Neurovasculares en la Esclerosis Lateral Amiotrófica

**Ciclo de Metodología Científica II-2019
Grupo 39**

Integrantes :

Br. Natalia Festi
Br. Mara González
Br. Rodrigo Jaluff
Lic. Mariana Kenny
Br. Damián Larrosa
Br. Cecilia Mestre

Orientadores:

Dra. Patricia Cassina
Dra. Eugenia Isasi

Alteraciones neurovasculares en la Esclerosis Lateral Amiotrófica

**Natalia Festi¹, Mara González¹, Rodrigo Jaluff¹, Mariana Kenny¹, Carlos Larrosa¹,
Cecilia Mestre¹, Patricia Cassina², Eugenia Isasi²**

**1- Estudiante de Medicina, Ciclo de Metodología Científica II, Facultad de Medicina,
Universidad de la República, Uruguay. La contribución en la realización del trabajo fue
equivalente a la de los demás estudiantes.**

**2- Docente supervisor. Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina,
Universidad de la República, Montevideo, Uruguay**

INDICE DE CONTENIDOS

Resumen/Abstract	4
1. Introducción	6
2. Aspectos genéticos y ambientales	7
3. Mecanismos patogénicos	8
4. ELA en Uruguay	8
5. Objetivos generales	9
6. Métodos	9
7. Unidad neurovascular	9
7.1 Definición. Componentes celulares e interacción	9
7.2 Células endoteliales	10
7.3 Membrana basal	10
7.4 Pericitos y macrófagos	10
7.5 Astroцитos perivasculares	11
7.6 Barrera hematoencefálica y hematomedular	12
7.7 Acoplamiento neurovascular	13
7.8 Sistema glinfático	14
8. Aspectos neurovasculares en ELA	14
8.1 Estudios iniciales	14
8.2 Hallazgos en modelos animales	15
8.3 Hallazgos en pacientes	16
9. Interrogantes y estudios prospectivos	19
10. Conclusiones	20
Bibliografía	21

Resumen

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una patología neurodegenerativa progresiva e incurable. Suele presentarse en adultos mayores aunque puede aparecer a cualquier edad entre los 20 y los 80 años. Afecta principalmente motoneuronas superiores (localizadas en corteza motora) e inferiores (que proyectan desde el tronco encefálico y la médula espinal hacia los músculos). Clínicamente, se manifiesta de forma insidiosa, con síntomas principalmente motores que evolucionan a parálisis de músculos esqueléticos y muerte a causa de insuficiencia ventilatorio-respiratoria, con una supervivencia de entre dos a cinco años desde el momento del diagnóstico. Si bien puede tener origen esporádico o familiar, se conoce que la etiopatogenia de esta enfermedad es multifactorial. En esta revisión se pretende analizar los diferentes componentes de la unidad neurovascular (UNV) y cómo su afectación estructural y funcional incide en la patogenia y evolución de la ELA. Se han reportado alteraciones en diversos componentes de la UNV, tanto en modelos animales como en tejido post-mortem humano afectados por ELA. Algunos de estos cambios incluyen daño endotelial, pérdida de moléculas de adhesión intercelular y proteínas de unión estrecha lo que genera hiper-permeabilidad de la barrera hemato-medular y hemato-encefálica con extravasación de componentes sanguíneos potencialmente neurotóxicos y edema extracelular. También ocurre afectación de astrocitos, pericitos y cambios a nivel de componentes de la lámina basal. En este sentido, se ha reportado disminución de la cantidad de pericitos y alteraciones estructurales a nivel de los pies astrocitarios, todo lo cual puede alterar la funcionalidad de la UNV, incluyendo el acoplamiento neurovascular y la regulación del flujo sanguíneo. Por otro lado, se ha reportado angiogénesis aberrante, disminución de la cantidad y longitud de los capilares a nivel espinal, contribuyendo a la hipoxia tisular. Aún queda por esclarecer cuánto contribuyen estos mecanismos a la muerte neuronal en ELA; y si son causa o consecuencia del proceso neurodegenerativo.

Palabras claves: Esclerosis Lateral Amiotrófica, microvasculatura, barrera hematoencefálica, barrera hematomedular, astrocitos, pericitos.

Abstract

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is an incurable progressive neurodegenerative disease. It usually occurs in older adults, although it can occur at any age between 20 and 80. It mainly affects upper motor neurons (from the cerebral cortex) and lower motor neurons (that project from the brainstem and spinal cord to the muscles). Clinically, it has an insidious onset, with symptoms progressing from muscle weakness to paralysis and death upon respiratory failure, with an estimated survival between two to five years from the time of diagnosis. While it may have sporadic or family origin, etiopathogenesis of this disease is known to be multifactorial. This review aims to analyze the different components of the neurovascular unit (NVU) and how its structural and functional impairment affect the onset and evolution of ALS. Alterations in several components of the NVU have been reported, both in animal models and in human post-mortem tissue. Some of these changes include endothelial damage, loss of intercellular adhesion molecules and tight-junction proteins, which results in hyper-permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barrier with extravasation of potentially neurotoxic blood components and extracellular edema. Astrocytes and pericytes compromise as well as changes of basal lamina components also occur. In this sense, a decrease in the number of pericytes and structural alterations at the level of astrocyte end-feets, can alter NVU function, including neuro-vascular coupling and blood flow regulation. On the other hand, aberrant angiogenesis, decrease in the amount and length of capillaries in the spinal cord have also been reported, contributing to tissue hypoxia. It remains to be clarified how much these mechanisms contribute to neuronal death in ALS; and if they are cause or consequence of the neurodegenerative process.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis, microvasculature, blood- brain barrier, blood-spinal cord barrier, astrocytes, pericytes.

1. INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), conocida también como enfermedad de Charcot, es una enfermedad neurológica progresiva y de mal pronóstico que afecta a las células nerviosas que controlan los músculos voluntarios¹. Los somas de las motoneuronas superiores (MNS) se localizan en la corteza cerebral y los de las motoneuronas inferiores (MNI) en el asta anterior de la médula espinal. Las MNS inervan a las MNI y estas a su vez a los músculos estriados esqueléticos del organismo. En la ELA ambas MN se ven afectadas².

El término actual con el que se conoce esta enfermedad se debe a Jean-Martin Charcot (1825-1893)³, neurólogo francés del Hospital Salpêtrière de París, quien publicó el primer artículo en 1874⁴. Estos estudios iniciales permitieron establecer, a través de un método anatomoclínico, la correlación entre las lesiones anatómicas del sistema nervioso central (SNC) y los signos observados en las autopsias de los pacientes fallecidos por ELA⁵.

La ELA tiene una incidencia de 1 a 2,6 casos por cada 100.000 personas, con una mortalidad estimada a los 3 - 4 años desde el inicio de los síntomas⁶. El 90% de los casos son esporádicos, es decir, se presentan de forma aleatoria sin un factor de riesgo claramente asociado⁷. Si bien se desconoce la causa por la que las MN degeneran en pacientes con ELA, se han considerado factores genéticos y ambientales, aunque solo el 10 - 15% de los pacientes suele tener historia familiar de la enfermedad⁸.

La ELA afecta en un rango de edad entre los 20 y los 80 años, con un promedio de inicio a los 56 años, siendo más frecuente en el sexo masculino⁹. La incidencia es mayor en hombres (3,0 casos por 100.000 personas-año); en comparación con mujeres (2,4 por 100.000 personas-años)¹⁰.

Los síntomas al inicio de la ELA pueden ser sutiles. Se observan signos de MNS tales como entecimiento del habla, espasticidad, hiperreflexia, signo de Hoffman o de Babinski, solos o en combinación con el síndrome de MNI: fasciculaciones, debilidad y atrofia muscular¹¹. Esto genera alteraciones de la marcha y en consecuencia dificultad en la realización de las actividades cotidianas¹².

Se distinguen tres formas clínicas de presentación de la enfermedad. La clásica, suele iniciar por una de las extremidades superiores; la pseudopolineurítica, comenzando por las extremidades inferiores en forma bilateral asimétrica, progresando lentamente de manera ascendente y la bulbar, de rápida evolución con disfasia, disfagia, sialorrea y aumento de la mucosidad. En la evolución de la enfermedad hay afectación de los músculos del aparato respiratorio y como consecuencia dificultad respiratoria, por lo que en etapas terminales es necesaria la asistencia ventilatoria mecánica. La falla respiratoria es la principal causa de muerte en los pacientes con ELA⁷.

Por otra parte, en ningún momento de la evolución hay afectación de los órganos de los sentidos y tampoco hay pérdida de control esfinteriano ni de la función sexual¹³

También se comprobó que hasta un 50% de los pacientes pueden padecer cambios conductuales y desarrollar deterioro cognitivo en el transcurso de la enfermedad, con signos clínicos similares a la demencia frontotemporal (DFT). Vale destacar que un 5 a 10% de los pacientes con ELA desarrollan concomitantemente DFT ¹⁴. Así también se evidenció que la mayoría de los pacientes con ELA sin deterioro cognitivo, presentan estados depresivos ¹³.

Para el tratamiento de ELA las drogas aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA, EEUU) son dos. El Riluzol es un compuesto que actúa en la recaptación de glutamato en la hendidura sináptica reduciendo el efecto excitatorio sobre las neuronas motoras ¹⁵ y presenta un resultado global limitado, aumentando la supervivencia solamente entre 2 y 4 meses ^{15 16}. El Edaravone, es un compuesto antioxidante que logra un enlentecimiento de la progresión de la enfermedad ¹⁷.

2. ASPECTOS GENÉTICOS Y AMBIENTALES

Más de 30 formas de ELA hereditarias se han identificado y al menos 17 genes están implicados en la misma ¹⁸. Ciertas mutaciones inciden en las características clínicas de la enfermedad ¹⁹, además de encontrarse relación entre la mutación génica y la región geográfica de origen de los pacientes. Dada la gran variedad de fenotipos de la enfermedad, sumado a los diferentes mecanismos moleculares, genéticos y ambientales que inciden en la misma, hace suponer que la etiología neurodegenerativa es multifactorial y diferente en cada paciente ²⁰.

En los casos familiares de ELA, el primer gen mutado identificado y estudiado fue el de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) en el año 1993 ²¹. Otras mutaciones también se han encontrado en otros genes como TARDBP, FUS, C9orf72, UBQLN2 ¹⁸. Por otro lado, se han observado cambios epigenéticos implicados en la patogénesis de la ELA ²², entre ellos, modificaciones en la metilación génica mediada por metiltransferasas de ADN como Dnmt3a, modificaciones post-traduccionales de las histonas y cambios a nivel de los microARNs que son reguladores de la expresión génica a nivel post-transcripcional.

Por otro lado, se ha estudiado la asociación entre la exposición a diferentes factores ambientales tales como ejercicio físico, fumar, exposición a toxinas y metales pesados, entre otros, sin poder establecer una relación clara entre ellos y el riesgo de desarrollar ELA. Al-Chalabi et al proponen el modelo Ambiente-Genética-Tiempo para explicar los componentes generadores de la enfermedad. Plantea que los factores genéticos determinan el riesgo global de la enfermedad, este riesgo aumenta la susceptibilidad y precocidad del diagnóstico ante mayor carga genética y le resta preponderancia a la influencia de los factores ambientales ²³.

3. MECANISMOS PATOGENICOS

Se conoce que diversos mecanismos celulares participan en la patogenia de la ELA. Muchos de los que se han planteado, surgen de estudios en modelos animales que sobreexpresan genes mutantes humanos vinculadas a los casos familiares de la enfermedad. Uno de los primeros propuestos fue la excitotoxicidad por acumulación de glutamato en las terminales sinápticas, lo que conduce a acumulación de calcio a nivel de la postsinapsis y la consiguiente activación de proteasas, fosfolipasas y endonucleasas, causando la muerte neuronal ²⁰, lo que resulta como evidencia sobre la cual se sustenta el uso de Riluzol como tratamiento. A esto se le suman estudios que muestran disminución de la expresión génica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)²⁴, un importante agente contra la excitotoxicidad mediada por glutamato y la ausencia del transportador GLT1 ²⁵ lo que conlleva a la degeneración y muerte de MN a nivel espinal. También fue evidenciada disfunción metabólica, la cual, mediante mutaciones genéticas, genera alteración en la captación y utilización de glucosa por los músculos esqueléticos y encéfalo, así como disfunción mitocondrial y disminución en la producción de ATP ²⁶. También se ve involucrado el estrés oxidativo, mediante generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno ²⁷. Otro mecanismo planteado implica alteraciones en el procesamiento de proteínas determinando la formación de agregados proteicos, inducidos probablemente por la forma mutada de SOD1, los cuales generan daño a nivel celular por diversos mecanismos propuestos ²⁰. Una de las hipótesis postuladas más recientemente, muestra que la disminución del flujo sanguíneo en el sistema nervioso genera hipoxia, la cual daña el ADN neuronal, produciendo alteración en la homeostasis de los canales de sodio y potasio ²⁸.

A nivel molecular, se observaron otros mecanismos, como la deficiencia de factores de crecimiento cuya expresión se ve disminuida a causa de la hipoxemia antes mencionada ²⁷. Otro factor involucrado es el disminución del factor de crecimiento insulínico (IGF), que en condiciones basales posee un rol protector a nivel mitocondrial y por delección genética del mismo, se estimula la mitofagia²⁹. Otros mecanismos moleculares implican alteraciones en el transporte axonal y elementos del citoesqueleto, los cuales se vieron alterados en diferentes modelos animales ²⁰ También hay alteraciones en el metabolismo de ADN y ARN, donde se observa afectación de proteínas involucradas en varios aspectos del mismo, como ser: transcripción, splicing (corte y empalme), transporte de ARN y traducción ³⁰.

4. ELA EN URUGUAY

En Uruguay se han realizado algunos estudios epidemiológicos sobre ELA. En primer lugar, un estudio poblacional realizado por Vázquez MC et al (2008)³¹ muestra las características epidemiológicas de los casos diagnosticados de ELA en todo el territorio nacional entre los años 2002 y 2003. En este, se señala la incidencia en hombres mayor que en mujeres (2:1). La edad promedio de diagnóstico varía con el sexo, siendo más tardío en hombres (65 - 74 años) que en mujeres (55 - 64 años). La incidencia anual media es de 1.42 por cada 100.000 habitantes, mientras que la prevalencia es de alrededor de 1.9 por cada 100.000 habitantes, manteniéndose en el rango de lo reportado internacionalmente. Otro estudio a destacar es el publicado por Gil et al (2009) ³² en el que se comparan las características epidemiológicas entre pacientes diagnosticados en Uruguay en el periodo 2002-2004 respecto a un centro de referencia en ELA, ubicado en Limoges (Francia), donde se concluye la importancia de tener un centro de referencia para esta enfermedad, y un último estudio retrospectivo realizado en 2018 que compara las características clínicas de pacientes con ELA

cubanos, irlandeses y uruguayos, en el periodo 1996 – 2017. En el artículo, se destaca la edad promedio de inicio de la enfermedad en Uruguay, siendo 58.2 años, ligeramente inferior a la de Irlanda y superior a la de Cuba. Respecto a la supervivencia, es similar en los tres países, no sobrepasa los 24 meses, desde el diagnóstico de la enfermedad³³.

Asimismo, existen varios equipos de investigación uruguayos que trabajan a nivel de investigación básica en ELA. En particular, han estudiado el rol de las células gliales, astrocitos y microglía en el desarrollo de la patología utilizando modelos murinos³⁴. Entre varias publicaciones, destacamos el trabajo de Diaz-Amarilla et al. (2011)³⁵ en donde se aísla por primera vez un fenotipo glial aberrante de la médula espinal de ratas sintomáticas transgénicas SOD1 G93A (modelo experimental de ELA). También, se destacan los trabajos de Trias et al. (2018)³⁶ sobre la evidencia de mastocitos y neutrófilos en la patología neuromuscular de la ELA y Miquel et al. (2012)³⁷ que trabajaron sobre la modulación de la función mitocondrial astrocitaria en vistas a mejorar la supervivencia y función motora en modelos animales.

5. OBJETIVO GENERAL

Realizar una revisión bibliográfica de las alteraciones neurovasculares en ELA, explorando estudios realizados en modelos animales y en seres humanos con el fin de comprender el rol de cada componente de la UNV y su importancia en esta patología. Por otra parte, se busca reconocer los aspectos del funcionamiento neurovascular no identificados en ELA hasta el momento y así plantear interrogantes sobre los posibles lineamientos de investigación para abordar a futuro.

6. MÉTODOS

Se realiza una revisión bibliográfica sobre el tema ELA buscando comprender cómo se afecta la unidad neurovascular en esta patología, utilizando como bases de datos PubMed. Se incluyeron artículos de revisión y artículos originales. En PubMed se utilizaron las siguientes palabras claves para la búsqueda bibliográfica: Amyotrophic lateral sclerosis; ALS; Neurovascular unit; ALS AND pericytes; ALS AND astrocytes; glymphatic system; neurovascular coupling AND ALS; Blood-brain barrier, endothelial cells and intercellular junctions, Basement membrane, Neurovascular AND ALS.

7. UNIDAD NEUROVASCULAR

7.1 Definición. Componentes celulares e interacción.

Las células vasculares, las terminales nerviosas y las células gliales están íntimamente relacionadas, conformando lo que se describe como unidad neurovascular (UNV) (Figura 1), la cual, a través de señales coordinadas y recíprocas entre sus componentes celulares, proporciona control local del flujo sanguíneo cerebral³⁸. Constituye una interface dinámica que participa de la regulación del flujo sanguíneo, el control de la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica (BHE), de la función inmunológica, entre otras. Es así que las células endoteliales, los pericitos y las células musculares lisas vasculares (CMLV), interactúan con los astrocitos, la microglia y las neuronas a través de diferentes mecanismos, tales como, la formación de uniones gap, proteínas de anclaje, proteínas señalizadoras y canales iónicos especializados como la acuaporina 4 (AQP4), canales de potasio, y el receptor de potencial transitorio (TRP)³⁹.

La UNV determina la regulación del flujo sanguíneo cerebral (FSC), dando lugar a la hiperemia funcional (HF) ante el aumento del metabolismo energético, según el nivel de actividad neuronal ⁴⁰. La misma contribuye, también, a la regulación de la permeabilidad de la barrera hematomedular (BHM) y BHE, participando de la interacción célula-matriz, del recambio de neurotransmisores, así como también del proceso de angiogénesis y neurogénesis⁴¹.

7.2 Células endoteliales

Las células endoteliales de origen mesenquimal, constituyen la barrera entre la sangre y el tejido en el SNC. Mantienen la adecuada actividad de la BHE y BHM por diferentes mecanismos: uniones estrechas que inhiben el flujo paracelular de solutos, transportadores, receptores, canales iónicos, moléculas reguladoras y bombas de flujo activo⁴². Así también, entre las variadas funciones que desempeña el endotelio, se destaca la regulación del flujo sanguíneo a través de sustancias vasoactivas que actúan sobre el músculo liso vascular y/o pericitos, regulando el tono vascular.

7.3 Membrana basal

En el SNC la membrana basal del endotelio capilar está formada principalmente por laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicanos ⁴², los cuales son producidos por las células endoteliales y pericitos. La membrana basal proporciona soporte mecánico a las células endoteliales y limita físicamente el paso de macromoléculas y células. La misma también participa de la señalización celular activando ligandos, factores de crecimiento y sus receptores, regulando múltiples funciones de las células endoteliales, que comprenden la supervivencia, la migración, la diferenciación, la adhesión y la polaridad. Tiene además un importante rol en la angiogénesis ⁴³.

7.4 Pericitos y macrófagos perivasculares

Los pericitos son células de origen mesenquimal que envuelven a los capilares de todo el organismo brindando estabilidad vascular y participando de la angioarquitectura⁴⁴. En los capilares cerebrales, los astrocitos y los pericitos rodean al endotelio con la membrana basal interpuesta. Los astrocitos se encuentran entrelazados con las neuronas, mientras que los pericitos lo están por prolongaciones citoplasmáticas y atravesando la membrana basal por los puntos de contacto que comunican directamente con las células endoteliales ⁴⁵.

Los pericitos pueden identificarse en los tejidos por la expresión de proteínas como el receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR β) y el antígeno neural/glial 2 (NG2) y alfa actina de músculo liso (α SMA), entre otros. Además, existirían diferentes subtipos de pericitos con diversidad de morfologías y expresión de proteínas; pericitos más cercanos a las arteriolas expresan más α SMA, poseen más cantidad de procesos circunferenciales y se encargan de la regulación del flujo sanguíneo cerebral; pericitos del medio del lecho capilar expresarían menos α SMA y cumplirían un papel importante en el mantenimiento de la BHE/BHM; pericitos cercanos a las vénulas regularían el ingreso de células del sistema inmune al parénquima⁴⁶.

En comparación con otros lechos vasculares, el cerebro tiene la más alta proporción de pericitos respecto a las células endoteliales y forman parte de la UNV como miembros multifuncionales⁴⁷. Los pericitos son células contráctiles, lo que ha sido confirmado con la observación de la expresión de proteínas contráctiles en estudios *in vitro* e *in vivo*⁴⁸. Además, a través de canales iónicos y receptores

que modulan los cambios intracelulares de calcio, regulan la permeabilidad, el tono vascular y así el flujo sanguíneo⁴⁹. Controlan también la remodelación microvascular (angiogénesis y la vasculogénesis), estabilizan los vasos sanguíneos, sintetizan proteínas de matriz, afectan a la coagulación de la sangre y a la función inmunológica⁵⁰.

Los macrófagos perivasculares son células que comparten la morfología de los macrófagos derivados de la sangre⁵¹. Su función es mantener vías de drenaje para los materiales solubles e insolubles del cerebro⁵², además de facilitar la afluencia de leucocitos a través de las barreras, durante procesos infecciosos⁵³.

7.5 Astrocitos perivasculares

Los astrocitos son el subtipo más abundante de células gliales del SNC, comprenden 20 - 50% del volumen del cerebro⁵⁴ y las terminaciones de los pies astrocitarios ocupan aproximadamente el 99% del espacio perivascular. Son células de origen neuroectodérmico que se sitúan entre las neuronas y el endotelio vascular. Esta disposición anatómica proporciona una fuerte evidencia de la estrecha relación entre los astrocitos y las células endoteliales⁵⁵. Los astrocitos tienen diversas funciones entre las que se destacan; el mantenimiento de la homeostasis del SNC, mediante el transporte de iones, eliminación y metabolismo de neurotransmisores, así como también, aporte de defensas antioxidantes. Por otro lado, mantienen la homeostasis metabólica del SNC mediante la síntesis y acumulación de glucógeno y el suministro de sustratos energéticos a las neuronas, lo cual es posible por los transportadores de membrana⁵⁶.

A nivel de la UNV, los astrocitos son los encargados de la regulación de las uniones estrechas y proteínas transportadoras endoteliales⁵⁷, regulando la permeabilidad de la BHE⁵⁸. Los astrocitos son células polares que poseen distintos dominios de membrana, por un lado, los pies terminales o podocitos astrocitarios rodean los vasos sanguíneos, por otro sus prolongaciones envuelven las sinapsis⁵⁹. Además, las prolongaciones astrocitarias junto con la lámina basal forman la glía limitante que recubre internamente la piamadre y rodea los espacios perivasculares⁶⁰. Son fundamentales en la homeostasis iónica e hídrica en el SNC⁶¹. Frente a una lesión, son capaces de transformar su fenotipo (astroglisis reactiva) para estabilizar el microambiente neuronal, a través de la liberación de citoquinas⁵⁴ y estimular los procesos de cicatrización tisular⁶².



Figura 1. Esquema de Unidad Neurovascular y sus componentes: terminaciones neuronales, pie terminal de los astrocitos, membrana basal, pericito, endotelio.

7.6. Barrera hemato-encefálica /hemato-medular

El concepto de barrera alude a un sistema de control del transporte desde la circulación sanguínea hacia el intersticio cerebral y viceversa. La BHE y la BHM regulan estrechamente el intercambio molecular y las fluctuaciones en la composición del líquido extracelular ⁶³ que se requiere para la función neuronal normal del SNC.

La barrera está constituida por endotelio vascular continuo con uniones intercelulares de tipo ocluyente. Además, la lámina basal de la pared capilar, los pericitos, los astrocitos perivascuales, y la microglía forman parte del sistema de difusión para proveer al cerebro de los nutrientes esenciales y encargarse del eflujo de productos de desecho, permitiendo mantener la homeostasis del SNC. La integridad estructural y funcional de todos los elementos que conforman las barreras es crítica y cualquier deterioro de estos componentes celulares puede causar alteraciones en la permeabilidad, perjudiciales para el SNC ⁶⁴.

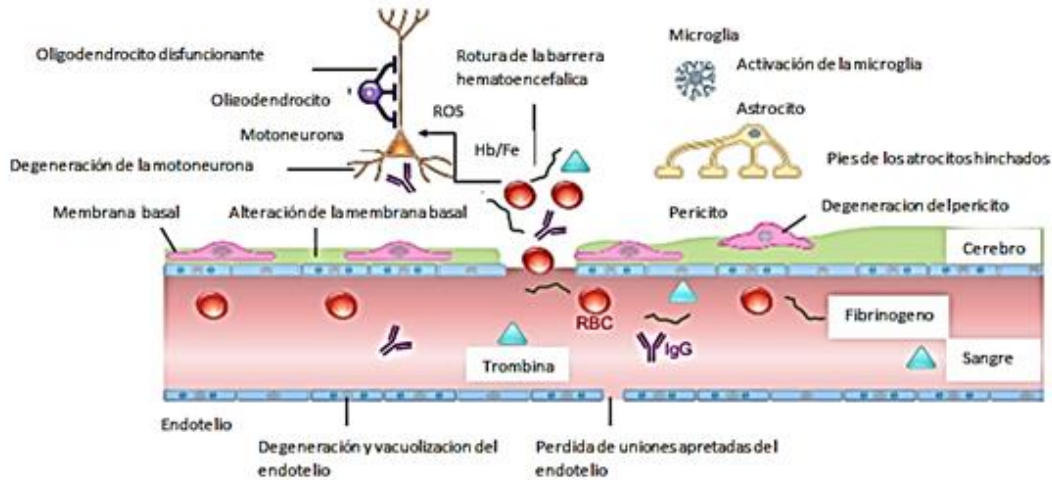


Figura 2. Disfunción de la barrera hematoencefálica en la ELA. Disrupción de la barrera hematoencefálica: pérdida de proteínas de uniones estrechas, degeneración de células endoteliales, extravasación de glóbulos rojos así como también acumulación perivascular de proteínas séricas en el parénquima de la médula espinal y la corteza motora tanto en humanos como en roedores que expresan diferentes mutaciones de SOD1. Los pies astrocíticos se hinchan y se disocian de los capilares, el espacio perivascular se agranda y la membrana basal se modifica. Imágen extraída de: Blood-brain barrier: from physiology to disease and back. Sweeney MD et al. (2019)⁴¹

7.7 Acoplamiento neurovascular

El SNC ejerce múltiples funciones lo que implica la metabolización de gran cantidad de sustrato para obtener energía (ATP). Aunque su peso representa solamente el 2 – 3% del total corporal en condiciones de reposo y normocapnia, utiliza un 20% del consumo corporal total de oxígeno, es decir extrae 8 ml/dl de oxígeno de la sangre arterial.

La alta tasa metabólica, la incapacidad de sintetizar y almacenar sustratos hacen que los nutrientes deban ser aportados de forma continua mediante flujo sanguíneo elevado⁶⁵.

La relación entre la actividad neuronal y el flujo sanguíneo que asegura el aporte energético adecuado en zonas de alta demanda metabólica se llama acoplamiento neurovascular (ANV)⁶⁶. La localización anatómica estratégica de los astrocitos, entre las neuronas y los vasos sanguíneos, junto con la expresión de los canales iónicos especializados y receptores, sugiere que los astrocitos pueden ser reguladores clave del estado de equilibrio del FSC y contribuyentes en la autorregulación cerebral (AC)⁶⁷. En este sentido, varios estudios apoyan la idea, aunque existe mucha controversia sobre la participación de los astrocitos en la regulación del tono vascular cerebral⁴⁰.

La actividad astrocitaria se ha estudiado a través de sondas que muestran el incremento intracelular de calcio llamado “ondas de calcio”, generadas en respuesta a la estimulación neuronal⁶⁸, y obteniendo como resultado una rápida vasodilatación *in vivo* con el consiguiente incremento en la demanda de glucosa y oxígeno⁶⁹. Estudios en rodajas del hipocampo y corteza cerebral animal, sugieren al glutamato como la principal señal activadora de respuestas neurovasculares. Sería también el aumento de calcio intracelular astrocitario el generador de otras señales vasoactivas como prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico (NO), ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), adenosina y ATP, todos los cuales son capaces de modular el tono arteriolar cerebral⁷⁰.

Por otra parte, también se ha evidenciado que existe liberación de sustancias vasoconstrictoras ⁶⁶ ante la escasez de oxígeno y aumento del lactato lo que a su vez provoca una baja disponibilidad de PGE2 favoreciendo la vasoconstricción⁷¹.

Se entiende, entonces, que los astrocitos participan en la hemodinámica cerebral y la modulación de la actividad sináptica actuando ante señales bidireccionales en la UNV. En condiciones de reposo, los astrocitos liberan de forma tónica vasoconstrictores, para asegurar el tono adecuado de circulación cerebral, pero ante la actividad neuronal, liberan agentes vasodilatadores para provocar una dilatación óptima, contribuyendo así a la regulación del tono vascular cerebral y FSC⁶⁶.

Por otro lado, un estudio realizado por Hall et al. (2014) propone a los pericitos como células participantes del ANV y efectoras en la regulación del FSC a nivel capilar, aunque todavía no queda claro las modalidades de comunicación célula a célula ni el rol preciso que ocupa el pericito versus el músculo liso arteriolar en la regulación del FSC en respuesta a la estimulación neuronal los pericitos inducen la vasodilatación capilar mediada por glutamato⁷², en presencia de agentes como el NO, adenosina y PGE2. Así también los pericitos responden contrayéndose ante señales como ATP, dopamina, angiotensina noradrenalina y ácido 20-hidroxieicosatetraenoico (20-HETE).

7.8 Sistema Glinfático

Cualquier tipo de actividad biológica está vinculada a la producción de potenciales productos tóxicos de desecho. En tejidos periféricos, el sistema linfático juega un papel esencial en la eliminación del exceso de líquidos y desechos metabólicos⁷³. En el caso del SNC, una serie de estudios recientes en modelos animales han identificado una vía organizada para la eliminación de residuos que utiliza el espacio perivascular para el transporte rápido de fluidos que depende de los canales de agua astrogliales AQP4 ⁷⁴, los cuales corresponden a canales de membrana permeables al agua que se encuentran predominantemente en el SNC, a nivel de los podocitos astrocitarios, y se los ha descrito como importantes reguladores del balance hídrico en el tejido nervioso. Se denomina sistema glinfático por su similitud con el sistema linfático periférico. La vía glinfática también está involucrada en el metabolismo cerebral, proporcionando tanto lípidos como glucosa. Se conoce que el ciclo sueño - vigilia regula la actividad glinfática, que es principalmente activa durante el sueño o la anestesia⁷⁵. Trabajos recientes han documentado la existencia de transporte glinfático, además, en el cerebro humano⁷⁶.

8. ASPECTOS NEUROVASCULARES EN ELA

8.1. Estudios iniciales

Los estudios sobre las alteraciones en la permeabilidad de la BHE y BHM se registran desde 1980 donde se demostraron niveles elevados de proteínas séricas y del complemento en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y tejido nervioso de pacientes con ELA. Experimentalmente, en ratones SOD1 G93A, en estadios tempranos de la enfermedad, se observó extravasación del colorante impermeable a la BHE / BHM, azul de Evans, en capilares de la médula espinal, conjuntamente con daño endotelial y disminución de laminina en la lámina basal ^{77 78 79}. Todo esto fue confirmado más tarde, también en modelos animales, por la aparición de cambios ultraestructurales en los vasos que se encontraban rodeando a las neuronas en degeneración, tanto en estadios tempranos como tardíos de la enfermedad⁶⁴. Además, en la etapa pre-sintomática de la enfermedad, se encontraron cambios en la

longitud de los capilares y del flujo sanguíneo en la médula espinal, indicando que la hipoxia y/o isquemia podrían provocar inflamación y contribuir a la neurodegeneración en la ELA⁸⁰. En la figura 2 se resumen las principales alteraciones de la BHE / BHM observadas en pacientes y modelos animales.

8.2. Hallazgos en modelos animales

Garbuzova-Davis et al. (2007)⁶⁴ mostraron en el modelo murino SOD1 mutante, degeneración mitocondrial en las células endoteliales que conforman la BHE y BHM, edema extracelular y de los pies astrocitarios junto a la degeneración de las neuronas motoras y astrocitos. Es importante destacar que el daño de la BHM junto a la disminución en el flujo sanguíneo a nivel de la médula espinal cervical y lumbar, y el acortamiento de los capilares (figura 3), ocurre antes de que comience la inflamación neurovascular y la muerte neuronal significativa⁸⁰.

Por otra parte, en animales SOD1 G93A se observó, sobreexpresión de AQP4 en la sustancia gris, pero disminución de su polarización a nivel de los pies terminales, lo que acompaña a la progresión de la enfermedad. Esto promovería el edema intra y extracelular provocando el daño del tejido perivascular, el desbalance iónico y la ruptura de la BHE / BHM⁸¹. También se encontró disminución de la molécula de adhesión endotelial PCAM-1, de la proteína de unión estrecha ocludina, del colágeno IV (principal componente de la lámina basal) y disociación entre el endotelio y los pies astrocitarios⁸².

Winkler et al. (2012)⁸³ demostraron que el recubrimiento pericitario de capilares en el asta ventral de la médula espinal es menor que en otras regiones del SNC. Además, un modelo murino mutante deficiente en pericitos (Pdgfr β ^{F7/F7}), presentó un aumento de la permeabilidad de las BHE y BHM y disminución de la expresión de proteínas de unión estrecha como ZO-1 y ocludina, evidenciando la importancia de los pericitos en el mantenimiento de la homeostasis de la UNV. Sorprendentemente, los autores demostraron, también, que los ratones mutantes deficientes en pericitos (Pdgfr β ^{F7/F7}), de 13 meses de edad, presentan una disminución de aproximadamente 19% en el número de MN de la médula espinal lumbar. Esto permitiría deducir que la disminución de pericitos sumado al envejecimiento, contribuiría a la degeneración de las MN.

Recientemente, Coatti et al. (2017)⁸⁴ evaluó el efecto de los pericitos y células mesenquimales estromales obtenidas a partir de tejido adiposo humano, que posteriormente se administraron a ratones SOD1 G93A de 8 semanas de edad, por vía intraperitoneal con inyecciones semanales, hasta la muerte natural del animal. neuronas motoras y otras células neuronales obtenidas de pacientes afectados por ELA, también fueron tratadas *in vitro*. Los resultados demostraron un aumento de la supervivencia en los ratones machos del modelo SOD1 G93A tratados únicamente con pericitos, no así en las hembras, que por su fenotipo más leve, tienen *per sé* una mayor tasa de supervivencia. Se observó además, el aumento de la expresión de genes de SOD1 y catalasa en el cerebro de los ratones machos tratados con pericitos, evidenciando la estimulación del sistema antioxidante.

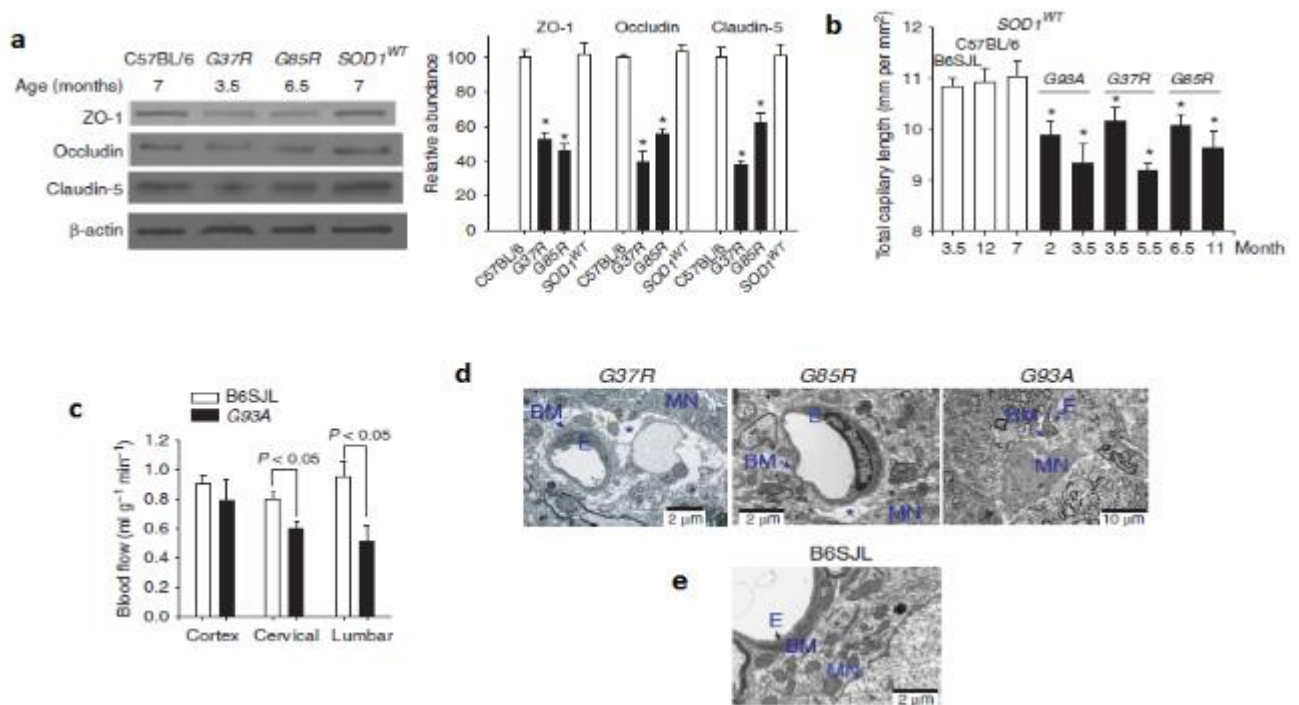


Figura 3. Alteraciones neurovasculares en modelos animales mutantes de SOD1. Adaptada de Zhong et al. (2008)⁸⁰. **(a)** Inmunoblot de ZO-1, ocludina, claudina-5 y control de carga (beta-actina) en muestras de microvasos espinales de ratones C57BL/6 y mutantes SOD1^{G37R}, SOD1^{G85R} y SOD1^{WT} (controles) de 7, 3.5, 6.5 y 7 meses de edad. A la derecha, cuantificación de la abundancia relativa de cada una de las proteínas de interés. En ambos casos, se evidencia marcada disminución de las tres proteínas estudiadas. **(b)** Longitud total de capilares en ratones control (B6SJL, C57BL/6 y SOD1^{WT}) y mutantes (G93A, G37R y G85R), observándose una disminución significativa en los modelos mutantes **(c)** Flujo sanguíneo a nivel de corteza cerebral, columna cervical y lumbar en ratones control (B6SJL) respecto a mutantes (G93A), en el que se evidencia disminución del flujo en los tres sectores, siendo mayor la diferencia a nivel lumbar. **(d)** Microscopía electrónica de transmisión de tejido nervioso de ratones G37R y G85R que muestra edema (asterisco) entre la pared capilar y las motoneuronas. Luz capilar colapsada (G93A). BM: Membrana basal. E: Endotelio. MN: Motoneurona. **(e)** Microscopía electrónica de transmisión de ratones B6SJL (controles) evidenciando un contacto neurona-vaso sanguíneo normal y endotelio intacto.

8.3. Hallazgos en pacientes

A partir de 1980 en diferentes estudios se encontraron aumentos en los depósitos de IgG, C3 y C4 del complemento en la médula espinal y la corteza motora e infiltración linfocitaria en la médula de pacientes afectados con ELA, sugiriendo alteración de la BHE / BHM^{84 85}. Posteriormente, se demostró una disminución en la expresión del ARNm de ZO-1 y ocludina, colágeno IV y disociación entre los pies astrocitarios y el endotelio en tejido de médula espinal *post-mortem* de pacientes con ELA esporádica y familiar⁸². Por otro lado, las metaloproteinasas de matriz (MMP) han sido involucradas en el desarrollo de la enfermedad; algunos estudios encontraron altos niveles de MMP-2 y MMP-9 en tejido y LCR tanto en modelos animales como en pacientes con ELA. En otros estudios, se ha demostrado que la actividad aumentada de las MMP degrada el colágeno IV de la matriz extracelular. El daño de la membrana basal en áreas relacionadas con la degeneración de las

MN fue reportado en las astas ventrales y funículos posteriores y laterales de médula espinal humana⁸⁶.

En otro trabajo donde se estudiaron muestras de médula espinal cervical de pacientes que fallecieron por ELA, además de observar ruptura de la BHM, por extravasación de eritrocitos y aumento de los depósitos de hemosiderina perivascular, se observó una marcada reducción de la cantidad de pericitos alrededor de los capilares (figura 4) y una angiogénesis aberrante, sugiriendo la implicación de estos procesos en la muerte neuronal a predominio de las astas ventrales de la médula espinal⁸⁷.

Estudios del metabolismo glucosídico mediante F-Fluorodeoxiglucosa PET / CT en pacientes con ELA, mostraron una hipercaptación de glucosa en toda la médula espinal con predominio cervical, con respecto a los controles. Por el contrario, se vió un hipometabolismo en la corteza cerebral frontal y dorso lateral, correspondientes a las áreas motoras. Los autores creen que la divergencia en el consumo de glucosa por el cerebro y la médula espinal de pacientes con ELA, se ve reflejado en el proceso de la enfermedad, con síntomas de motoneurona superior y/o inferior⁸⁸.

Este hipermetabolismo en la médula espinal, podría explicarse por un incremento de la glucólisis, como medida compensatoria a la falta de producción de ATP por la mitocondria y por la excitación neuronal dada por el efecto tóxico de la acumulación de glutamato⁸⁹.

Recientes estudios *in vivo* utilizando espectroscopia de tensor de difusión y evaluando las propiedades de difusión de metabolitos neuronales y gliales, observaron aumento en la difusibilidad de los marcadores en la corteza motora de 24 pacientes con ELA respecto de 27 sujetos controles. Esta elevación en los tres marcadores se interpreta como daño neuronal y reactividad de astrocitos y microglia en respuesta a la inflamación y/o isquemia y constituye la primera evidencia *in vivo* de cambios microestructurales en cerebro de pacientes con ELA⁹⁰.

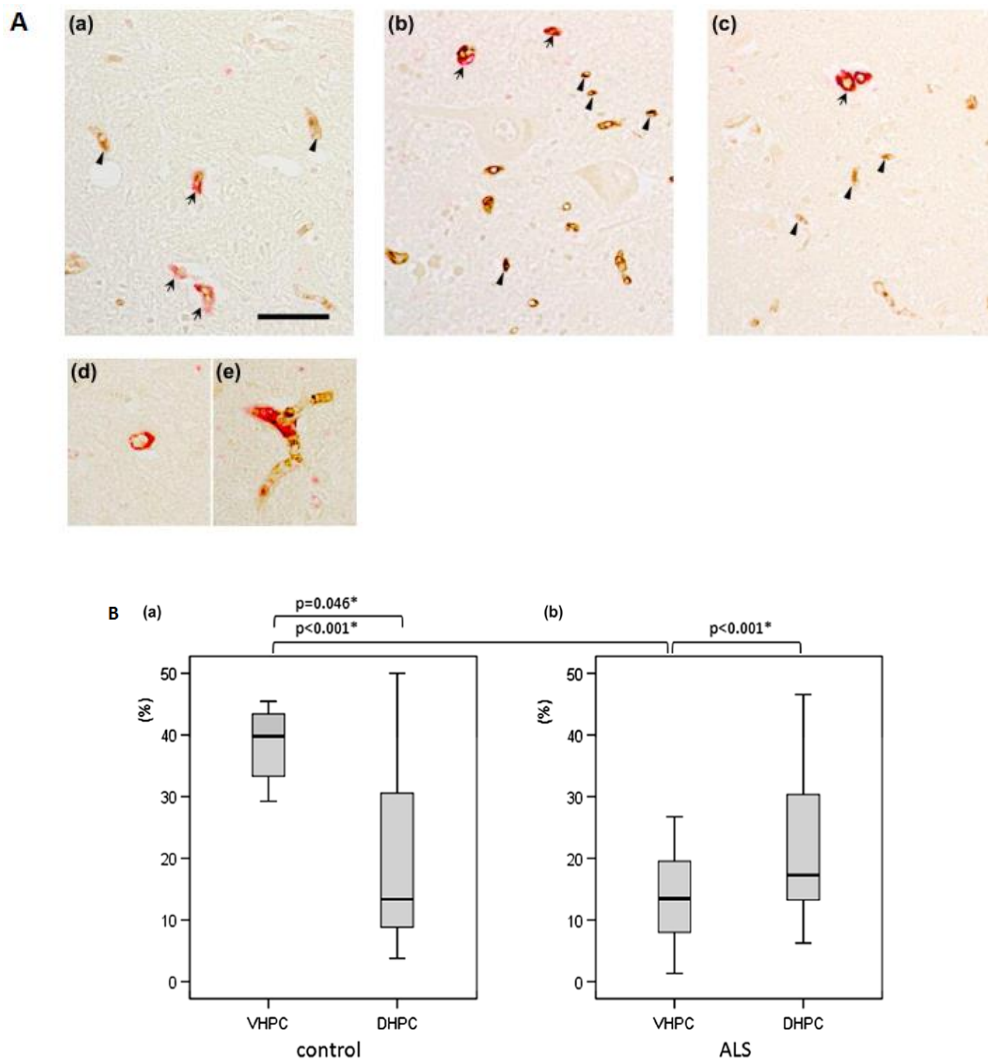


Figura 4. Disminución de pericitos en médula espinal de pacientes de ELA. Modificado de Yamadera et al. (2015)⁸⁷.

A. Doble inmunohistoquímica para CD34 (marrón) y a-SMA (rojo) en el asta anterior de la médula espinal lumbar extraída *post mortem* de pacientes con ELA y sujetos controles. Se observa mayor cantidad de vasos doble marcados en el tejido de sujetos controles (a, d y e) respecto de pacientes con ELA (b y c). En ELA se observan varios perfiles de vasos CD34+ que no colocalizan con aSMA (b y c, flechas). **B.** Cuantificación del recubrimiento-de pericitos (% de vasos aSMA+ y CD34+, respecto del total de vasos CD34+) en el asta anterior (a) (VHPC) y posterior (b) (DHPC) en control, y paciente con ELA (ALS). Se observa disminución significativa del área cubierta por pericitos a nivel del asta anterior (VHPC) de pacientes con ELA.

9. INTERROGANTES Y ESTUDIOS PROSPECTIVOS

De acuerdo a la literatura revisada, es objetiva la necesidad de continuar investigando sobre la ELA y sus mecanismos etiopatogénicos para poder avanzar en nuevos tratamientos y mejorar la calidad de vida de los pacientes, así como también el pronóstico de la enfermedad.

Gran parte de los estudios realizados hasta la fecha, han sido en modelos animales. Estos buscan profundizar en los mecanismos celulares y moleculares más relevantes que participan en la etiopatogenia de la enfermedad y probar posibles fármacos curativos o que enlentescan la progresión de la enfermedad y logren mayor sobrevida. Sin embargo, muchos fármacos probados en animales no resultaron beneficiosos en humanos. Esto nos deja como interrogante qué similitud tienen los mecanismos celulares explorados en animales respecto al desarrollo de la patología en humanos.

Centrándonos en la patogenia de la enfermedad y los aspectos neurovasculares, sería importante obtener un conocimiento cabal sobre cuál es el rol de cada célula que forma la UNV, cómo se comunican entre sí y cuán afectadas llegan a estar conforme avanza la enfermedad. Al mismo tiempo, resulta crucial mejorar la comprensión de los mecanismos de ANV y regulación del FSC que están alterados en la ELA.

Por otro lado y teniendo en cuenta un concepto relativamente nuevo como es el de sistema glinfático, se podría estudiar su funcionamiento, tanto en esta patología neurodegenerativa como en otras, donde la depuración de proteínas mal plegadas está disminuida y por ende aumenta su acumulación, sumado al de otras sustancias tóxicas del SNC.

En relación a los pericitos, células que participan en la regulación del FSC y homeostasis de la BHE, se comienza a estudiar su participación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Poco se conoce sobre las alteraciones estructurales y funcionales de estas células en la ELA y en este sentido, sería importante explorar si hay diferencias entre pericitos de tejidos normales y los afectados por ELA en distintos estadios de la patología. Los pericitos pueden ser identificados en preparaciones de tejido vivo o fijado. En la figura 5 se muestra rodajas de médula espinal de animales Wild Type (WT) y SOD1 G93A donde se logran identificar pericitos *in situ* formando parte de los capilares del sistema nervioso. Además, pueden obtenerse cultivos de pericitos aislados. En la figura 6 se muestran cultivos primarios purificados, a partir de ratas WT y SOD1 G93A de un mes de vida, donde se observan cambios en la expresión de los marcadores de pericitos. Tanto el análisis de rodajas vivas y fijadas de médula espinal como de los cultivos primarios de pericitos, utilizando modelos animales experimentales con ELA, son estrategias disponibles para la realización de estudios prospectivos referentes a las características funcionales de estas células.

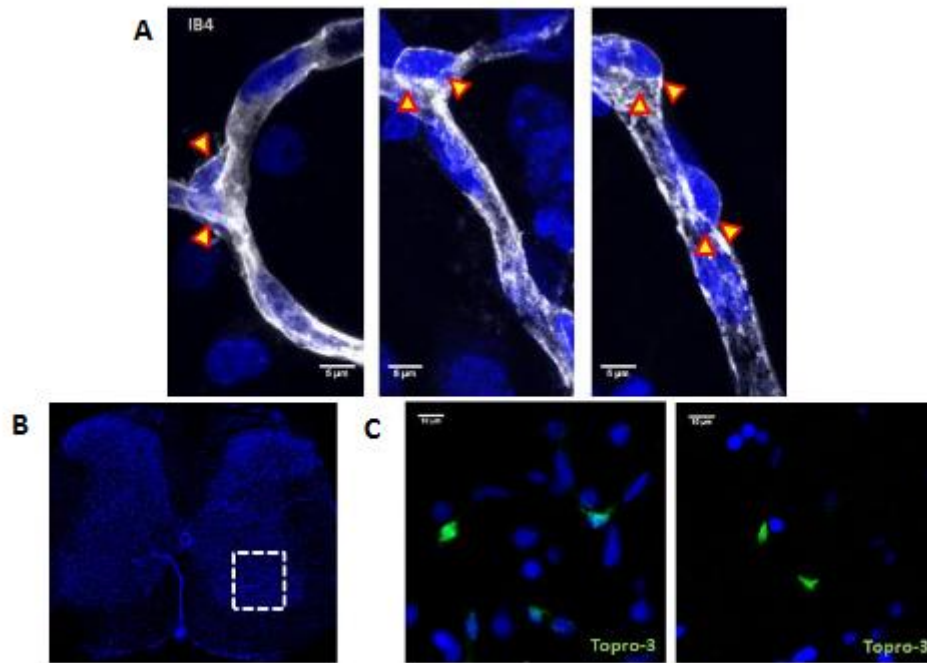


Figura 5. A. Capilares cerebrales marcados con isolectina B4 fluorescente (gris) y núcleos teñidos con DAPI (azul). Pericitos se señalan con flechas amarillas/rojas. Imagen cortesía de Nils Korte (UCL, UK). **B.** Imagen topográfica de un corte transversal de médula espinal lumbar teñida con DAPI (azul) de una rata de 30 días. **C.** Pericitos marcados en rodajes vivos de médula espinal lumbar con Topro-3 (verde) y núcleos con DAPI. A la izquierda se observa una imagen de un animal WT y a la derecha de un animal SOD193A (modelo experimental de ELA). Imágenes B y C obtenidas en el microscopio confocal Leica TCS SP5 de la Unidad de Microscopía de Facultad de Medicina.

10. CONCLUSIONES

A partir de esta revisión bibliográfica exhaustiva concluimos:

- Si bien el conocimiento de la ELA ha tenido grandes avances, aún quedan muchas interrogantes sobre el tema.
- Cada componente de la UNV es de vital importancia y la sola alteración de uno de ellos, desencadena una cascada desestabilizadora que da como resultado la enfermedad.
- Los hallazgos en modelos animales de ELA demostraron alteración de la BHE/BHM, disminución del flujo sanguíneo, edema celular y tisular, así como también alteraciones de las células que conforman la UNV. Por otro lado, gran parte de los estudios en humanos con ELA fueron realizados en material cadavérico, los cuales han demostrado similitudes en las alteraciones de la UNV, a pesar que los resultados no son del todo extrapolables.
- Aún queda por esclarecer cuánto contribuyen las alteraciones neurovasculares a la muerte neuronal en ELA y si son causa o consecuencia del proceso neurodegenerativo.

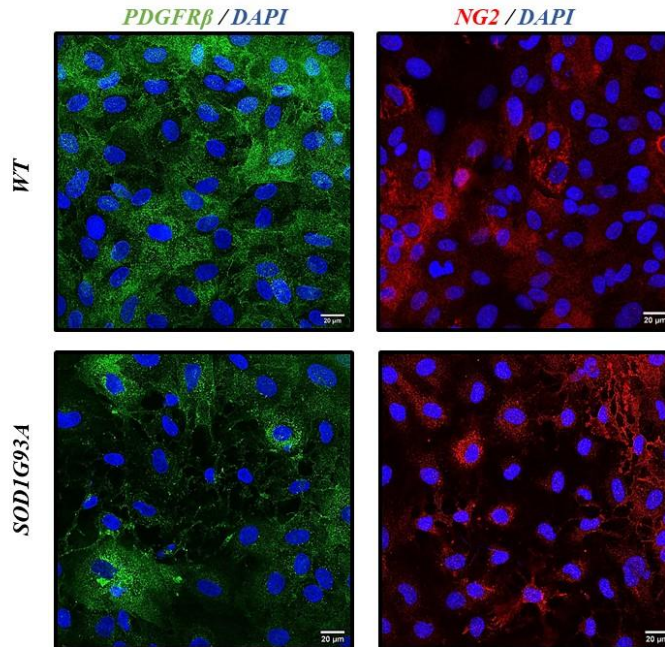


Figura 6. Inmunohistoquímica de cultivos primarios de pericitos obtenidos de cerebro de ratas Wild Type (WT) (arriba) y transgénicos SOD1 G93A (abajo). Se utilizó el marcador nuclear DAPI y los marcadores pericitarios: PDGFR β (verde) y NG2 (rojo) que marca el citoplasma y la membrana de los pericitos. Imágenes obtenidas en el microscopio confocal Leica TCS SP5 de la Unidad de Microscopía de Facultad de Medicina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic Lateral Sclerosis. N Engl J Med [Internet]. 2001 May 31 [cited 2019 Oct 30];344(22):1688–700. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11386269>
2. Gold, E.F., y Morrison, K.E. (2006). La Esclerosis Lateral Amiotrófica (enfermedad de la motoneurona): los mecanismos propuestos y las vías de tratamiento. Opciones de los expertos de Medicina Molecular, 8, 1-22.
3. Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive: avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle. Épineière. Paris: Masson. [Print]. 1869
4. Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. Muscle Nerve [Internet]. 2000 Mar [cited 2019 Oct 30];23(3):336–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679709>

5. Gordon P. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An update for 2013 Clinical Features, Pathophysiology, Management and Therapeutic Trials. *Aging Dis* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2019 Oct 30];04(05):295–310. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24124634>
6. Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. In: *Handbook of clinical neurology* [Internet]. 2016 [cited 2019 Oct 30]. p. 225–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27637961>
7. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* [Internet]. 2011 Oct 20 [cited 2019 Oct 30];72(2):245–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944778>
8. Armon C. An Evidence-Based Medicine Approach to the Evaluation of the Role of Exogenous Risk Factors in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroepidemiology* [Internet]. 2003 [cited 2019 Oct 30];22(4):217–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12792141>
9. Lomen-Hoerth C. Amyotrophic lateral sclerosis from bench to bedside. *Semin Neurol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2019 Oct 30];28(2):205–11. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2008-1062265>
10. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ, et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2019 Oct 30];81(4):385–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19710046>
11. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL, 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 Other Motor Neuron Disord* [Internet]. 2000 Dec [cited 2019 Oct 30];1(5):293–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11464847>
12. Martí-Fàbregas J, Pradas J, Illa I. [Prognostic factors in amyotrophic lateral sclerosis]. *Neurologia* [Internet]. 1996 May [cited 2019 Oct 30];11(5):174–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8754633>
13. Kurt A, Nijboer F, Matuz T, Kübler A. Depression and anxiety in individuals with amyotrophic lateral sclerosis: epidemiology and management. *CNS Drugs* [Internet]. 2007 [cited 2019 Oct 30];21(4):279–91. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00023210-200721040-00003>
14. van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* [Internet]. 2017 Nov 4 [cited 2019 Oct 30];390(10107):2084–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28552366>
15. Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2012 Mar 14 [cited 2019 Oct 30];(3):CD001447. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD001447.pub3>

16. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 1994 Mar 3 [cited 2019 Oct 30];330(9):585–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8302340>
17. Yoshino H. Edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2019;19(3):185–93. Available from: <https://doi.org/10.1080/14737175.2019.1581610>
18. Mathis S, Goizet C, Soulages A, Vallat JM, Masson G Le. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review. *J Neurol Sci*. 2019;399(August 2018):217–26.
19. Garbuzova-Davis S, Rodrigues MCO, Hernandez-Ontiveros DG, Louis MK, Willing AE, Borlongan C V., et al. Amyotrophic lateral sclerosis: A neurovascular disease. *Brain Res*. 2011;1398:113–25.
20. Parayath NN, Pawar G, Avachat C, Miyake MM, Bleier B, Amiji MM. Neurodegenerative disease. *Nanomedicine Inflamm Dis*. 2017;289–318.
21. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* [Internet]. 1993 Mar 4 [cited 2019 Oct 29];362(6415):59–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446170>
22. Bennett SA, Tanaz R, Cobos SN, Torrente MP. Epigenetics in amyotrophic lateral sclerosis: a role for histone post-translational modifications in neurodegenerative disease. *Transl Res* [Internet]. 2019;204:19–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.10.002>
23. Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: A conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2013;9(11):617–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2013.203>
24. Moreau C, Devos D, Brunaud-Danel V, Defebvre L, Perez T, Destée A, et al. Paradoxical response of VEGF expression to hypoxia in CSF of patients with ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2019 Oct 30];77(2):255–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16421133>
25. Sugiyama K, Tanaka K. Spinal cord-specific deletion of the glutamate transporter GLT1 causes motor neuron death in mice. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2018 Mar 4 [cited 2019 Aug 2];497(2):689–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29458024>
26. Zufiría M, Gil-Bea FJ, Fernández-Torrón R, Poza JJ, Muñoz-Blanco JL, Rojas-García R, et al. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Prog Neurobiol*. 2016;142:104–29.
27. Anand A, Thakur K, Gupta PK. ALS and oxidative stress: The neurovascular scenario. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013.

28. Sofroniew M V. Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *Neurosci* [Internet]. 2005 Oct 29 [cited 2019 Oct 29];11(5):400–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151042>
29. Wen D, Cui C, Duan W, Wang W, Wang Y, Liu Y, et al. The role of insulin-like growth factor 1 in ALS cell and mouse models: A mitochondrial protector. *Brain Res Bull* [Internet]. 2019 Jan [cited 2019 Aug 2];144:1–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923018305641>
30. Kim J, Lee H, Lee JH, Kwon D, Genovesio A, Fenistein D, et al. Dimerization, Oligomerization, and Aggregation of Human Amyotrophic Lateral Sclerosis Copper/Zinc Superoxide Dismutase 1 Protein Mutant Forms in Live Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 May 23 [cited 2019 Oct 30];289(21):15094–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24692554>
31. Vázquez MC, Ketzoian C, Legnani C, Rega I, Sánchez N, Perna A, et al. Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Uruguay: A population-based study. *Neuroepidemiology*. 2008;30(2):105–11. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/120023>
32. Gil J, Vazquez MC, Ketzoian C, Perna A, Marin B, Preux PM, et al. Prognosis of ALS: Comparing data from the Limousin referral centre, France, and a Uruguayan population. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009;10(5–6):355–60.
33. Ryan M, Zaldívar Vaillant T, McLaughlin RL, Doherty MA, Rooney J, Heverin M, et al. Comparison of the clinical and genetic features of amyotrophic lateral sclerosis across Cuban, Uruguayan and Irish clinic-based populations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90(6):659–65.
34. Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, et al. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Rev* [Internet]. 2004 Dec [cited 2019 Oct 24];47(1–3):263–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572176>
35. Diaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martinez-Palma L, Cassina P, et al. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2019 Oct 24];108(44):18126–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22010221>
36. Trias E, King PH, Si Y, Kwon Y, Varela V, Ibarburu S, et al. Mast cells and neutrophils mediate peripheral motor pathway degeneration in ALS. *JCI Insight* [Internet]. 2018 Oct 4 [cited 2019 Oct 23];3(19). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30282815>
37. Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Bolatto C, Trías E, Gandelman M, et al. Modulation of Astrocytic Mitochondrial Function by Dichloroacetate Improves Survival and Motor Performance in Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. Ferreira ST, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Apr 3 [cited 2019 Oct 23];7(4):e34776. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22509356>

38. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2019 Oct 30];98(1):239–389. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00042.2016>
39. Brayden JE, Earley S, Nelson MT, Reading S. Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2019 Oct 30];35(9):1116–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1681.2007.04855.x>
40. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* [Internet]. 2007 Nov 26 [cited 2019 Oct 30];10(11):1369–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965657>
41. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic B V. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2019 Oct 30];99(1):21–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30280653>
42. Krause D, Mischeck U, Galla HJ, Dermietzel R. Correlation of zonula occludens ZO-1 antigen expression and transendothelial resistance in porcine and rat cultured cerebral endothelial cells. *Neurosci Lett* [Internet]. 1991 Jul [cited 2019 Oct 30];128(2):301–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030439409190284Z>
43. Taraboletti G, D’Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as Membrane Vesicle-Associated Components by Endothelial Cells. *Am J Pathol* [Internet]. 2002 Feb [cited 2019 Oct 29];160(2):673–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839588>
44. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic B V. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci* [Internet]. 2011 Nov 26 [cited 2019 Oct 29];14(11):1398–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22030551>
45. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* [Internet]. 2006 Oct 12 [cited 2019 Oct 30];443(7112):700–4. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature05193>
46. Attwell D, Mishra A, Hall CN, O’Farrell FM, Dalkara T. What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2016 Feb 14 [cited 2019 Oct 30];36(2):451–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26661200>
47. Armulik A, Mäe M, Betsholtz C. Pericytes and the blood-brain barrier: recent advances and implications for the delivery of CNS therapy. *Ther Deliv* [Internet]. 2011 Apr [cited 2019 Jun 27];2(4):419–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826851>
48. Hirschi KK, D’Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* [Internet]. 1996 Oct [cited 2019 Oct 30];32(4):687–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8915187>

49. Fernández-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, Priller J, Lindauer U. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Dec 21 [cited 2019 Oct 30];107(51):22290–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1011321108>
50. Birbrair A, Delbono O. Pericytes are Essential for Skeletal Muscle Formation. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2015 Aug 21 [cited 2019 Jun 27];11(4):547–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12015-015-9588-6>
51. Sasaki A, Nakazato Y, Ogawa A, Sugihara S. The immunophenotype of perivascular cells in the human brain. *Pathol Int* [Internet]. 1996 Jan [cited 2019 Jun 27];46(1):15–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10846545>
52. Kida S, Steart P V., Zhang E-T, Weller RO. Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. *Acta Neuropathol* [Internet]. 1993 May [cited 2019 Oct 30];85(6):646–52. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00334675>
53. Polfliet MMJ, Zwijnenburg PJG, van Furth AM, van der Poll T, Döpp EA, Renardel de Lavalette C, et al. Meningeal and Perivascular Macrophages of the Central Nervous System Play a Protective Role During Bacterial Meningitis. *J Immunol* [Internet]. 2001 Oct 15 [cited 2019 Oct 29];167(8):4644–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591794>
54. Rossi D, Volterra A. Astrocytic dysfunction: Insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* [Internet]. 2009 Oct 28 [cited 2019 Jun 27];80(4–5):224–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631259>
55. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability*. *J Anat* [Internet]. 2002 Jun [cited 2019 Jun 27];200(6):629–38. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x>
56. Verkhratsky A, Nedergaard M. The homeostatic astroglia emerges from evolutionary specialization of neural cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2016 Aug 5 [cited 2019 Oct 30];371(1700):20150428. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2015.0428>
57. Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* [Internet]. 1991 Dec 1 [cited 2019 Jun 27];115(6):1725–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1661734>
58. Bauer H, Stelzhammer W, Fuchs R, Weiger TM, Danninger C, Probst G, et al. Astrocytes and Neurons Express the Tight Junction-Specific Protein Occludin in Vitro. *Exp Cell Res* [Internet]. 1999 Aug 1 [cited 2019 Oct 29];250(2):434–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413597>

59. Allen NJ, Eroglu C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2019 Oct 24];96(3):697–708. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29096081>
60. Nakazawa E, Ishikawa H. Ultrastructural observations of astrocyte end-feet in the rat central nervous system. *J Neurocytol* [Internet]. 1998 Jun [cited 2019 Oct 24];27(6):431–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10192524>
61. Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2009 Jan 16 [cited 2019 Oct 30];335(1):75–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633647>
62. Sofroniew M V., Vinters H V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2010 Jan 10 [cited 2019 Jun 27];119(1):7–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012068>
63. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood–brain barrier: an overview. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2004 Jun [cited 2019 Oct 30];16(1):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207256>
64. Garbuzova-Davis S, Haller E, Saporta S, Kolomey I, Nicosia S V., Sanberg PR. Ultrastructure of blood–brain barrier and blood–spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain Res* [Internet]. 2007 Jul 9 [cited 2019 Oct 30];1157:126–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512910>
65. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* [Internet]. 2010 Nov 10 [cited 2019 Oct 30];468(7321):232–43. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature09613>
66. Filosa JA, Morrison HW, Iddings JA, Du W, Kim KJ. Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. *Neuroscience* [Internet]. 2016 May 26 [cited 2019 Oct 30];323:96–109. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452215003139>
67. Iddings JA, Kim KJ, Zhou Y, Higashimori H, Filosa JA. Enhanced parenchymal arteriole tone and astrocyte signaling protect neurovascular coupling mediated parenchymal arteriole vasodilation in the spontaneously hypertensive rat. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2015 Jul 11 [cited 2019 Oct 30];35(7):1127–36. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.2015.31>
68. Cornell-Bell A, Finkbeiner S, Cooper M, Smith S. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* (80-) [Internet]. 1990 Jan 26 [cited 2019 Oct 30];247(4941):470–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1967852>
69. Filosa JA. Vascular tone and neurovascular coupling: considerations toward an improved in vitro model. *Front Neuroenergetics* [Internet]. 2010 [cited 2019 Oct 30];2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnene.2010.00016/abstract>
70. Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann K-A, Pozzan T, et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* [Internet].

2003 Jan 25 [cited 2019 Oct 30];6(1):43–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12469126>

71. Gordon GRJ, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GCR, MacVicar BA. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* [Internet]. 2008 Dec 29 [cited 2019 Oct 30];456(7223):745–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18971930>

72. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* [Internet]. 2014 Apr 26 [cited 2019 Oct 30];508(7494):55–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670647>

73. Schmid-Schonbein GW. Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev* [Internet]. 1990 Oct 1 [cited 2019 Oct 30];70(4):987–1028. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2217560>

74. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* [Internet]. 2012 Aug 15 [cited 2019 Oct 30];4(147):147ra111. Available from: <http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.3003748>

75. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, et al. Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. *Science* (80-) [Internet]. 2013 Oct 18 [cited 2019 Oct 30];342(6156):373–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24136970>

76. Eide PK, Ringstad G. MRI with intrathecal MRI gadolinium contrast medium administration: a possible method to assess glymphatic function in human brain. *Acta Radiol open* [Internet]. 2015 Nov 17 [cited 2019 Oct 30];4(11):2058460115609635. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2058460115609635>

77. Leonardi A, Abbruzzese G, Arata L, Cocito L, Vische M. Cerebrospinal fluid (CSF) findings in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* [Internet]. 1984 Apr [cited 2019 Oct 30];231(2):75–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00313720>

78. Donnenfeld H, Kascsak RJ, Bartfeld H. Deposits of IgG and C3 in the spinal cord and motor cortex of ALS patients. *J Neuroimmunol* [Internet]. 1984 Feb [cited 2019 Oct 30];6(1):51–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165572884900420>

79. Annunziata P, Volpi N. High levels of C3c in the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* [Internet]. 1985 Jul 29 [cited 2019 Oct 30];72(1):61–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0404.1985.tb01548.x>

80. Zhong Z, Deane R, Ali Z, Parisi M, Shapovalov Y, O'Banion MK, et al. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci*. 2008;11(4):420–2.

81. Nicaise C, Soyfoo MS, Authelet M, De Decker R, Bataveljic D, Delporte C, et al. Aquaporin-4 Overexpression in Rat ALS Model. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2019 Oct 30];292(2):207–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ar.20838>.

82. Miyazaki K, Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, et al. Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 2011;89(5):718–28.
83. Winkler EA, Sengillo JD, Bell RD, Wang J, Zlokovic B V. Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2012;32(10):1841–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2012.113>
84. Coatti GC, Frangini M, Valadares MC, Gomes JP, Lima NO, Cavaçana N, et al. Pericytes Extend Survival of ALS SOD1 Mice and Induce the Expression of Antioxidant Enzymes in the Murine Model and in iPSCs Derived Neuronal Cells from an ALS Patient. *Stem Cell Rev Reports*. 2017;13(5):686–98.
85. Engelhardt JI, Appel SH. IgG Reactivity in the Spinal Cord and Motor Cortex in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch Neurol* [Internet]. 1990 Nov 1 [cited 2019 Oct 30];47(11):1210–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122877>.
86. Niebroj-Dobosz I, Janik P, Sokołowska B, Kwiecinski H. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2019 Oct 30];17(2):226–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-1331.2009.02775.x>
87. Yamadera M, Fujimura H, Inoue K, Toyooka K, Mori C, Hirano H, et al. Microvascular disturbance with decreased pericyte coverage is prominent in the ventral horn of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* [Internet]. 2015 Aug 27 [cited 2019 Oct 31];16(5–6):393–401. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21678421.2015.1011663> Fi
88. Marini C, Morbelli S, Cistaro A, Campi C, Caponnetto C, Bauckneht M, et al. Interplay between spinal cord and cerebral cortex metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2019 Oct 30];141(8):2272–9. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/141/8/2272/5042840>
89. Yamashita T, Hatakeyama T, Sato K, Fukui Y, Hishikawa N, Ohta Y, et al. Flow-metabolism uncoupling in the cervical spinal cord of ALS patients. *Neurol Sci* [Internet]. 2017 Apr 24 [cited 2019 Oct 30];38(4):659–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28120243>
90. Reischauer C, Gutzeit A, Neuwirth C, Fuchs A, Sartoretti-Schefer S, Weber M, et al. In-vivo evaluation of neuronal and glial changes in amyotrophic lateral sclerosis with diffusion tensor spectroscopy. *NeuroImage Clin* [Internet]. 2018 [cited 2019 Oct 30];20:993–1000. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213158218303127>