

NEUROINFLAMAÇÃO NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

NEUROINFLAMMATION IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Laura de Godoy Rouseff Prado^{1,2,3}, Érica Leandro Marciano Vieira^{1,2}, Natália Pessoa Rocha², Vitor de Godoy Rouseff Prado², Leonardo Cruz de Souza^{1,2,3}, Antônio Lúcio Teixeira^{1,2,3}

RESUMO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) esporádica é uma doença neurodegenerativa que acomete o neurônio motor. Sua etiologia ainda não foi totalmente esclarecida e é considerada multifatorial. O objetivo desse trabalho é fazer uma revisão narrativa sobre os mecanismos fisiopatológicos da ELA esporádica, com foco no papel da neuroinflamação, além de descrever estudos envolvendo a pesquisa de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico. O processo de neuroinflamação na ELA é considerado secundário às alterações que levam à morte neuronal, podendo influenciar na taxa de progressão da doença. Existem diversos estudos sobre o perfil dos fatores inflamatórios na ELA, por vezes com resultados contraditórios, reforçando a dificuldade de análise desses fatores num organismo dinâmico. Ainda assim, no contexto da ELA, o estudo de possíveis biomarcadores diagnósticos e/ou prognósticos é válido e de grande interesse, pois permitiria um avanço nos ensaios clínicos que buscam novos tratamentos, bem como na condução e planejamento de cada caso.

Palavras-chave: Esclerose Lateral Amiotrófica; Inflamação; Biomarcador.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects the motor neuron. Its etiology has not been fully clarified and is considered multifactorial. The aim of this study is to perform a narrative review on the pathophysiological mechanisms of sporadic ALS, focusing on the role of neuroinflammation. It will also discuss studies investigating diagnostic and prognostic biomarkers. Neuroinflammation in ALS is considered to be a secondary event, triggered by neuronal death, and it may influence disease progression. There are several studies on inflammatory factors in ALS, some with contradictory findings, reinforcing the difficulty of assessing these factors in a dynamic organism. Even so, in ALS context, the study of possible diagnostic and/or prognostic biomarkers is valid and of great interest. This may allow the advance of clinical trials that investigate new treatments, as well as the management of individual cases.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis; Inflammation; Biomarker

¹Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil;

²Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil;

³Ambulatório de Doenças Neuromusculares, Departamento de Neurologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

Endereço para correspondência: Laura de Godoy Rouseff Prado. Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, UFMG. Av. Professor Alfredo Balena, nº190 / sl 281. CEP: 30130-100, Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brasil; E-mail: laura.grp@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) caracteriza-se por quadro progressivo de degeneração do neurônio motor e, conseqüentemente, parestesia gradual da musculatura estriada esquelética com incapacidade funcional secundária e sobrevida média de 3-5 anos. De acordo com os aspectos genéticos, a ELA pode ser classificada em: i) familiar, isto é, com causa genética definida (5-10% dos casos); e ii) esporádica, quando não há evidência de padrão de herança familiar (90-95% dos casos)¹.

O processo fisiopatológico envolvido na ELA esporádica é multifatorial e ainda não foi totalmente elucidado. Evidências sugerem vários mecanismos envolvidos, sendo os principais: excitotoxicidade mediada pelo glutamato, mutação de diversos genes como *SOD1*, *TARDBP/TDP-43* e *FUS*, expansões repetidas de hexanucleotídeos (GGGGCC) do gene *C9orf72*, anormalidades de fatores neurotróficos, neuroinflamação, desarranjo dos neurofilamentos e disfunção mitocondrial, entre outros².

Neste artigo abordaremos o papel da neuroinflamação na ELA, além de descrever estudos envolvendo a pesquisa de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico.

MÉTODOS

Foi realizada uma revisão não sistemática na base de dados PubMed/MEDLINE. Os termos utilizados na pesquisa foram “amyotrophic lateral sclerosis” em associação com “inflammation”, “IL-2”, “IL-4”, “IL-6”, “IL-8”, “IL-10”, “IL-17”, “MCP-1”, “IP-10”, “RANTES”, “MIG”, “TNF”, “sTNFR” “IFN- γ ”, “biomarker”. A seleção dos artigos ocorreu a critério dos autores, sendo priorizados trabalhos originais da última década realizados em humanos.

NEUROINFLAMAÇÃO NA ELA

Sinais de inflamação e ativação do sistema imune já foram evidenciados no sangue, líquido e em estudos *post-mortem* de pacientes com ELA³. O processo de inflamação do sistema nervoso central (SNC) na ELA, também chamada de neuroinflamação, é provavelmente secundário às alterações que levam à morte neuronal, possivelmente influenciando na taxa de progressão da doença e não no mecanismo inicial³⁻⁵.

As células da glia, em especial as micróglia e astrócitos, são células não neuronais que promovem suporte e proteção aos neurônios, garantindo assim a homeostase

do meio³. A micróglia atua como uma das primeiras linhas de defesa do sistema nervoso central, sendo considerada um componente do sistema imune inato⁶. A micróglia é sensível às mudanças patológicas encontradas na ELA, por exemplo, anormalidades no envelhecimento e agregação de proteínas e aumento de adenosina trifosfato (ATP) liberada de neurônios motores degenerados, modificando assim a sua estrutura e função após detectá-las^{6,7}. Estudos utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET) e marcadores microgliais (ex.: (18)F-DPA-714) possibilitam a avaliação da ativação microglial *in vivo*. Nesse sentido, pacientes recém-diagnosticados com ELA apresentaram aumento da ativação microglial na área motora primária, área motora suplementar e lobo temporal em comparação com controles⁸. A ativação microglial inicial leva à liberação de mediadores inflamatórios, que por sua vez, favorecem a disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) e a entrada de leucócitos da periferia para o SNC⁹.

Em estudo *post-mortem* foi verificado aumento da proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) no líquido e nas células da glia de pacientes com ELA em comparação com controles¹⁰. A liberação de MCP-1 pela micróglia promove a infiltração de monócitos através da BHE. Esses monócitos adquirem fenótipo pró-inflamatório e contribuem para a morte do neurônio motor⁷. Não apenas os monócitos provenientes do sistema imune periférico, mas também os linfócitos podem contribuir para a progressão do processo neurodegenerativo observado na ELA. Os linfócitos T podem se diferenciar em subtipos de T auxiliares (Th) 1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg), determinados pelo perfil de citocinas produzidas no meio extracelular^{7,9,11}. Estudos indicam que os subtipos Th1 e Th17 promovem um estado de inflamação crônica, contribuindo para o processo de neurodegeneração. Já os subtipos Th2 e Treg reduzem a ativação microglial e promovem um ambiente neuroprotetor, reduzindo assim a progressão da doença^{7,9}. Estudos que corroboram esta hipótese encontraram nos pacientes com ELA correlação negativa entre a concentração de linfócitos Treg e a taxa de progressão da ELA^{12,13}. Entretanto, sugere-se que esse ambiente neuroprotetor ocorra somente nas fases iniciais da doença^{7,12}.

Além de micróglia e células imunes periféricas infiltradas no SNC, os astrócitos também desempenham papel fundamental no processo neuroinflamatório associado à neurodegeneração. Postula-se que a liberação de fatores neurotróficos e a recaptção do glutamato pelos astrócitos atuem como neuroprotetores na fase inicial da ELA. A

liberação do fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β) por astrócitos também auxilia na supressão da ativação microglial. Entretanto, à medida que a doença progride, os fatores pró-inflamatórios liberados no meio promovem a ativação astrocitária, levando à redução da liberação de fatores neurotróficos, hiporegulação (*down-regulation*) dos transportadores de glutamato (GLT1/EAAT2) e liberação de fatores neurotóxicos e citocinas^{6,7}.

Importante lembrar que a degeneração neuronal na ELA não ocorre somente no corpo do neurônio motor, mas também na periferia, em seu axônio. A degeneração axonal promove o recrutamento de macrófagos para o sítio da lesão já detectado em estudos com modelos animais. Entretanto, não se sabe ao certo o papel do macrófago na progressão da doença, já que alguns estudos demonstraram efeitos neuroprotetores⁷.

A ativação imune leva a liberação de diversas citocinas anti e pró-inflamatórias no SNC e na periferia. Não se sabe ao certo o papel de cada citocina na fisiopatologia da ELA e se elas teriam uma ação individual ou em sinergismo³.

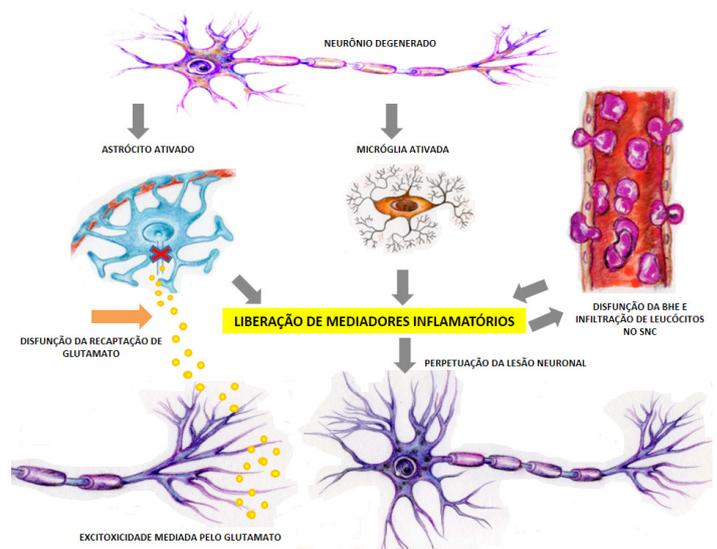
Disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) na ELA

Há evidências de disfunção da BHE e redução do número de pericitos (célula mesenquimal que auxilia no suporte dos vasos sanguíneos) em pacientes com ELA quando comparados a controles. Além disso, foi descrita uma correlação negativa ($r=-0,75$; $p<0,01$) entre o número de pericitos e a magnitude da disfunção da BHE¹⁴. O aumento nos níveis de albumina, imunoglobulina (Ig)G e proteína do Complemento C3 no líquido de pacientes com ELA em comparação aos controles corrobora a hipótese de que há disfunção da BHE¹⁵⁻¹⁷. Estudos utilizando modelos animais de ELA também demonstraram ruptura da BHE nos estágios iniciais e avançados da doença¹⁸. A correlação positiva entre níveis de neurofilamentos no sangue e no líquido de pacientes com ELA também corrobora esse dado¹⁹.

Como já descrito anteriormente, a ativação microglial resulta em liberação de mediadores inflamatórios, que por sua vez, favorecem a disfunção da BHE na ELA⁹. Essa disfunção já foi evidenciada em outros trabalhos^{14,18,19} e sua importância está em permitir estudos com dosagem de fatores inflamatórios na periferia, como no soro/plasma, que possam refletir o que ocorre no SNC. A partir destes estudos, poderão ser identificados biomarcadores ou até

medicamentos que possam ser dosados e administrados na periferia, sendo, portanto, menos invasivos para os pacientes.

A figura 1 mostra de forma simplificada como ocorre o processo de neuroinflamação na ELA.



Legenda: BHE: barreira hematoencefálica; SNC: sistema nervoso central

Autora: Heloisa Godoy

Figura 1 – Mecanismos envolvidos na neuroinflamação na ELA

Perfil de citocinas séricas e líquóricas na ELA

Os resultados dos estudos transversais envolvendo a análise de fatores inflamatórios no líquido e/ou sangue de pacientes com ELA encontram-se resumidos na tabela 1^{10,20-30}. Poucos são os estudos que avaliaram o perfil de citocinas na ELA de forma longitudinal. Um deles avaliou 13 pacientes com ELA e 7 controles hígidos por meio de duas coletas de sangue com intervalo de 6 meses. Não foram feitas análises de pareamento entre os grupos em relação à idade e sexo. Na primeira avaliação (A1) houve aumento significativo do nível de IL-6 nos pacientes em comparação com controles ($p<0,05$). Na segunda avaliação (A2), o nível de IL-6 foi semelhante entre os grupos, porém significativamente menor ($p<0,01$) ao comparar os pacientes na A2 com A1. Ainda na A2, houve redução significativa de IL-2 ($p<0,05$) e aumento significativo de IL-8 ($p<0,01$) nos pacientes comparados com controles. A análise de TNF, IL-4 e IL-10 não evidenciou diferenças significativas entre os grupos²⁷.

Um estudo recente avaliou a concentração sérica de fatores inflamatórios de 95 pacientes com ELA e 88 controles (não pareados em relação à idade e sexo). Além disso, no mesmo estudo, foi realizada uma avaliação longitudinal de 59 pacientes com seis coletas realizadas a cada 2-4 meses, com o máximo de 2 anos de seguimento.

Foi encontrado um aumento significativo nos níveis de TNF, IL-2, IL-8, IL-4 e IL-10 e redução significativa nos níveis de IFN- γ em pacientes com ELA comparados com controles. Após análise multivariada, mantiveram-se os aumentos significativos nos níveis de IL-6, TNF e IL-4, e a redução significativa nos níveis de IFN- γ em pacientes comparados aos controles. Houve correlação negativa entre a pontuação na escala funcional e a concentração de IL-6 e TNF. Níveis elevados de IL-2 foram preditores de baixa sobrevida. Na análise longitudinal das citocinas (N=59), somente a IL-6 apresentou aumento significativo na comparação entre a primeira e a sexta coleta. Não foram encontradas associações entre as citocinas e a progressão da doença durante o estudo longitudinal²⁸.

De forma geral, os estudos demonstraram aumentos nos níveis das citocinas analisadas. No entanto, resultados controversos foram encontrados, reforçando a complexidade da análise desses fatores em humanos, já que diversas variáveis, por vezes difíceis de serem excluídas, poderiam influenciar o resultado final. Entretanto, dos trabalhos analisados, encontramos certa concordância de resultados em relação aos níveis de IL-8, IP-10, IL-6 e IL-17. Consideramos que esses fatores, se analisados em conjunto, podem ser considerados como possíveis biomarcadores, entretanto estudos longitudinais e envolvendo tamanhos amostrais maiores devem ser realizados para validar essa possibilidade.

A comprovação do papel da inflamação na fisiopatologia da ELA possibilitaria o desenvolvimento de medicamentos que atuem na redução da progressão da doença. De fato, diversos ensaios clínicos com agentes anti-inflamatórios e imunossupressores já foram realizados ou estão em andamento, infelizmente ainda sem eficácia comprovada. Dentre esses medicamentos podemos citar a ciclosporina, minociclina, celecoxibe e glatiramer³¹.

Tabela 1 – Estudos envolvendo mediadores inflamatórios no líquido e/ou sangue de pacientes com ELA

| FATOR | MATERIAL | RESULTADO | REFERÊNCIA |
|--------|----------|---|------------|
| | Líquor | Aumentado* | 10 |
| | Líquor | Aumentado* | 20 |
| | Sangue | Sem diferença* | |
| | | Sem associação com idade de início ou duração da doença | |
| | Líquor | | 21 |
| | Sangue | Aumentado* | |
| MCP-1 | | Aumentado* | |
| | Líquor | | 22 |
| | Sangue | Sem diferença* | |
| | | Sem diferença* | |
| | Líquor | | 23 |
| | | Preditor de maior sobrevida | |
| | Líquor | | 24 |
| | | Aumentado** | |
| | | Correlação negativa com escala funcional | |
| | Líquor | Aumentado** | 25 |
| | Sangue | Aumentado** | |
| RANTES | | Sem correlação com duração da doença | |
| | Sangue | Preditor de menor sobrevida | 23 |
| | Líquor | Preditor de menor sobrevida | 23 |
| | Líquor | Correlação negativa com escala funcional | 26 |
| IL-8 | Líquor | Aumentado** | 24 |
| | Sangue | Aumentado* | 27 |
| | Sangue | Correlação positiva com a duração da doença | 23 |
| IP-10 | Líquor | Aumentado** | 24 |
| | | Correlação positiva com a duração da doença | |
| | Líquor | Aumentado* | 26 |
| IL-2 | Sangue | Reduzido* | 27 |
| | Sangue | Preditor de baixa sobrevida | 28 |
| | Líquor | Sem diferença** | 24 |
| IL-4 | Sangue | Sem diferença* | 27 |
| | Sangue | Aumentado* | 28 |
| | Líquor | Aumentado* | 26 |
| IL-6 | Sangue | Aumentado* | 27 |
| | Sangue | Aumentado* | 28 |
| | | Aumentado no estudo longitudinal | |
| IL-10 | Sangue | Preditor de maior sobrevida | 23 |
| | Sangue | Sem diferença* | 27 |
| | Líquor | Aumentado* | 26 |
| IL-17 | Líquor | Aumentado** | 24 |

| | | | |
|---------------|--------|---|----|
| | Sangue | Aumentado* | 29 |
| | | Correlação positiva com a duração da doença | |
| TNF | Líquor | Aumentado** | 24 |
| | Sangue | Sem diferença* | 27 |
| | Sangue | Aumentado* | 28 |
| | Sangue | Aumentado* | 30 |
| sTNFR | Sangue | Sem correlação com duração ou gravidade da doença | |
| | Sangue | Aumentado* | 29 |
| | | Correlação positiva com a duração da doença | |
| IFN- γ | Líquor | Aumentado** | 24 |
| | Sangue | Reduzido* | 28 |

*Na comparação entre pacientes com ELA e controles ** Na comparação entre pacientes com ELA e controles com outras doenças neurológicas não-inflamatórias (DNNI)

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS COMO BIOMARCADORES NA ELA

No contexto da ELA, a definição de um biomarcador diagnóstico e/ou prognóstico permitiria um avanço nos ensaios clínicos, bem como na condução e planejamento de cada caso. Diversos biomarcadores no líquido, sangue, urina e saliva já foram ou estão sendo testados. Dentre eles podemos citar aminoácidos, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, metabólitos e neurofilamentos^{19,23}.

Os neurofilamentos são filamentos intermediários que compõem a maior parte do citoesqueleto neuronal e são divididos em relação ao seu peso molecular em cadeia leve, intermediária e pesada³². Uma revisão sistemática seguida por meta-análise concluiu que os neurofilamentos de cadeia leve e pesada no líquido, apesar de não serem específicos da doença, são potenciais biomarcadores de progressão da ELA, visto que se correlacionaram negativamente com a duração da doença³². Em relação aos demais possíveis biomarcadores da ELA, considera-se, atualmente, que os neurofilamentos estão em estágio mais avançado de estudos, com sensibilidade variando de 77-97,3% e especificidade entre 71-95%, podendo ser dosados no líquido ou no sangue¹⁹.

As citocinas e quimiocinas, já descritas anteriormente, também são consideradas potenciais biomarcadores na ELA. Entretanto, os diversos estudos nessa área não mostraram resultados concordantes, sugerindo que a inflamação na ELA possa ser regulada de forma independente por outros fatores ainda não totalmente compreendidos,

como comorbidades clínicas, nível de atividade motora, uso de medicamentos e drogas¹⁹.

A excitotoxicidade mediada pelo glutamato é considerada um dos mecanismos fisiopatológicos da ELA. O riluzol, que é uma medicação antiglutamatérgica, foi liberada para o uso em pacientes em 1995 após estudo que demonstrou aumento da sobrevivência em relação ao placebo³³. Por esse motivo, a concentração sérica e líquórica de glutamato também foi avaliada nos pacientes. No líquido, alguns estudos demonstraram aumento, porém, outros, não evidenciaram diferença significativa ao comparar pacientes com ELA e controles¹⁹. Resultados controversos também foram encontrados ao avaliar a concentração de glutamato no sangue em resposta ao tratamento de 6 meses com riluzol¹⁹.

Dos estudos envolvendo análise de metabólitos na urina, podemos destacar o aumento do nível de receptor de neurotrofina p75 ao comparar pacientes com ELA e controles e sua correlação com o declínio na escala funcional³⁴. Achados semelhantes foram encontrados ao avaliar os níveis de 8-hydroxil-2'-deoxiguanosina, um marcador de dano do DNA secundário ao estresse oxidativo¹⁹. Ambos os metabólitos são potenciais biomarcadores de prognóstico na ELA, com a vantagem de serem dosados na urina.

Existem poucos estudos envolvendo análise de metabólitos na saliva. Dentre eles podemos citar a análise do nível de cortisol 30 minutos após acordar, que se mostrou significativamente menor nos pacientes em relação aos controles. Essa redução apresentou correlação significativa com piora da funcionalidade e com a gravidade de sintomas depressivos³⁵.

Alguns biomarcadores em potencial já estão sendo utilizados em ensaios clínicos, como IL-6, IL-10, TNF, neurofilamentos, entre outros. Alguns são dosados sozinhos e outros em associação com o objetivo de aumentar a sensibilidade e/ou especificidade. Um desses exemplos é a análise líquórica da combinação de IL-10, IL-6, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IL-2 e IL-15 que apresentou sensibilidade de 87,5% e especificidade de 91,2% para diferenciar pacientes com ELA de controles com outras doenças¹⁹.

Atualmente, os estudos longitudinais estão recebendo maior atenção com o objetivo de determinar se há mudança nos níveis dos biomarcadores ao longo da progressão da doença.

CONCLUSÃO

A ELA é uma doença neurodegenerativa incapacitante e incurável, que apresenta etiologia multifatorial. A inflamação está implicada na sua fisiopatologia, influenciando na taxa de progressão da doença. Os estudos em humanos são complexos e susceptíveis a variáveis de difícil exclusão. Apesar dessas dificuldades, a definição do papel da neuroinflamação na ELA é importante, pois pode permitir a descoberta de biomarcadores e de novos alvos terapêuticos.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Lancet*. 2011;377:942-55
- Oliveira AS et al. Esclerose Lateral Amiotrófica: sua manifestação no Brasil. *Revista Neurociências*. 2006; 14(Supl 2)
- Malaspina A, Puentes F1, Amor S. Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective. *Int Immunol*. 2015;27(3):117-29.
- Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006; 312, 1389-1392
- Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009; 4:389-398
- Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2015;12:364-375
- Zhao W, Beers DR, Appel SH. Immune-mediated Mechanisms in the Pathoprogession of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013; 8(4): 888-899
- Corcia P, Tauber C, Vercoillie J, Arlicot N, Prunier C, Praline J et al. Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52941
- González H, Pacheco R. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroinflammation*. 2014;11:201
- Henkel JS, Enghelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, et al. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol*. 2004;55:221-35
- De Souza AWS, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Cruvinel WM, Andrade LEC, et al. Sistema Imunitário - Parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os polos de tolerância e autoimunidade. *Rev Bras Reumatol* 2010;50(6):665-94
- Rentzos M, Evangelopoulos E, Sereti E, Zouvelou V, Marmara S, Alexakis T, Evdokimidis I. Alterations of T cell subsets in amyotrophic lateral sclerosis: a systemic immune activation? *Acta Neurol Scand*: 2012; 125: 260-264.
- Henkel JS, Beers DR, Wen S, Rivera AL, Toennis KM, Appel JE, Zhao W, Moore DH, Powell SZ, Appel SH: Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med*. 2013, 5:64-79.
- Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH, Zlokovic BV. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2013;125(1):111-20
- Leonardi A, Abbruzzese G, Arata L, Cocito L, Vísche M. Cerebrospinal fluid (CSF) findings in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 1984; 231: 75-78.
- Annunziata P, Volpi N. High levels of C3c in the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*. 1985; 72: 61-64.
- Apostolski S, Nicolic J, Bugarski-Prokopljevic C, Miletic V, Pavlovic S, et al. Serum and CSF immunological findings in ALS. *Acta Neurol Scand*. 1991; 83:96-98.
- Garbuzova-Davis S, Saporta S, Haller E, Kolomey I, Bennett SP, Potter H, et al. Evidence of Compromised Blood-Spinal Cord Barrier in Early and Late Symptomatic SOD1 Mice Modeling ALS. *Westermarck P, ed. PLoS ONE*. 2007;2(11):e1205
- Vu LT, Bowser R. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2016 Dec 8. [Epub ahead of print]
- Wilms H, Sievers J, Dengler R, Buffler J, Deuschl G, Lucius R. Intrathecal synthesis of monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1) in amyotrophic lateral sclerosis: further evidence for microglial activation in neurodegeneration. *Journal of Neuroimmunol*. 2003;144:139-42
- Baron P, Bussini S, Cardin V, Corbo M, Conti G, Galimberti D, et al. Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2005;32: 541-544.
- Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology*. 2004 May 25;62(10):1758-65
- Su XW, BS; Simmons Z, Mitchell RM, Kong L, Stephens HE, Connor JR. Biomarker-Based Predictive Models for Prognosis in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2013;70(12):1505-1511.
- Tateishi T, Yamasaki R, Tanaka M, Matsushita T, Kikuchi H, Isobe N, et al. CSF chemokine alterations related to the clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2010;222:76-81
- Rentzos M, Nikolaou C, Rombos A, Boufidou F, Zoga M, Dimitrakopoulos A, et al. RANTES levels are elevated in serum and cerebrospinal fluid in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2007; 8:283-287
- Mitchell RM, Freeman WM, Randazzo WT, Stephens HE, Beard JL, Simmons Z, et al. A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2009;72:14-19
- Ehrhart J, Smith AJ, Kuzmin-Nichols N, Zesiewicz TA, Jahan I, Shytle RD, et al. Humoral factors in ALS patients during disease progression. *Journal of Neuroinflammation*. 2015;12:127
- Lu CH, Allen K, Oei F, Leoni E, Kuhle J, Tree T, et al. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;3:e244
- Babu GN, Kumar A, Chandra R, Puri SK, Kalita J, Misra UK. Elevated inflammatory markers in a group of amyotrophic lateral sclerosis patients from northern India. *Neurochem Res*. 2008;33(6):1145-9
- Poloni M, Facchetti D, Mai R, Micheli A, Agnoletti L, Francolini G, et al. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2000;287(3):211-4
- Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol*. 2014; 13:1127-38
- Xu Z, Henderson RD, David M, McCombe PA. Neurofilaments as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;12;11(10):e0164625
- Hugon J. Riluzole and ALS therapy. *Wien Med Wochenschr*. 1996;146(9-10):185-7
- Shepherd SR, Chataway T, Schultz DW, Rush RA, Rogers ML. The extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLOS ONE*. 2014;9(1): e87398
- Roosendaal B, Kim S, Wolf OT, Kim MS, Sung K-K, Lee S. The cortisol awakening response in amyotrophic lateral sclerosis is blunted and correlates with clinical status and depressive mood. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(1):20-26.