

11233

9



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA  
Y NEUROCIROGIA

NEUROTOXICIDAD POR ESTRES OXIDATIVO Y  
FACTORES DE RIESGO EN ESCLEROSIS  
LATERAL AMIOTROFICA ESPORADICA

235

## TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
NEUROLOGO CLINICO  
P R E S E N T A:

DR. LUIS MANUEL MURILLO BONILLA

TUTOR DE TESIS

DRA. CATHERINE BOLL WOWHRLLEN

COAUTOR

DR. SARUG REYES MORALES

MEXICO, D. F. FEBRERO DEL 2001





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE MEDICINA  
Univ. de San Carlos

FEB 27 2001

Unidad de Servicios Escolares  
Unidad de Registro

Dra. Teresa Corona Vázquez  
Jefatura de Enseñanza

Dr. Fernando Zermeño Phòls  
Jefatura División de Neurología

Dra. Catherine Boll Woehrlen  
Clínica de Nervio y Músculo



INSTITUTO NACIONAL  
DE NEUROLOGIA Y  
NEUROCIQUIRIA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS

## INDICE

I.	Dedicatoria	4
II.	Agradecimientos	5
III.	Citas	6
IV.	Antecedentes	7 - 15
V.	Justificación	16
VI.	Hipótesis	17
VII.	Objetivos	18
VIII.	Pacientes y Métodos	19 - 21
IX.	Consideraciones éticas	22
X.	Análisis estadísticos	23
XI.	Resultados	24 - 31
XII.	Discusión	32 - 35
XIII.	Conclusiones	36
XIV.	Anexos	37 - 41
XV.	Bibliografía	42 - 46

## Dedicatoria

A: Irma y Carlos, mis padres

Irma, Carlos y Juan, mis hermanos

Por ser la familia que siempre quise tener. Por su apoyo, amor y paciencia que me brindaron en tiempos difíciles. Gracias a Uds. Soy lo que quise ser.... Médico

A: A los niños Pobres de México

Que por pensar en ellos me he esforzado para conseguir mis metas, esperando poder pagar de alguna manera la amistad que por siempre me han brindado.

A: Mis amigos

Que hemos compartido momentos de alegría y tristeza

A: Mi sobrina

Que aunque no la conozco aun, se que tendrá una vida llena de dicha y amor

## Agradecimientos

En especial a los pacientes que me permitieron la realización de este trabajo, esperando que de alguna manera pueda servir para encontrar la causa de su enfermedad, una de la mas devastadoras de la humanidad.

A los directivos del Instituto Nacional de Neurología: Dr. Julio Sotelo, Dra. Teresa Corona, Dr. Ignacio Ruiz, y a todos los que ahora omito, ya que depositaron su confianza en mi al seleccionarme como residente de neurología. Espero no haberlos defraudado.

Quiero agradecer de manera especial a la Dra. Catherine Boll Woehrlen coordinadora de la clínica de nervio y músculo, quien deposito su confianza en mi para la realización de esta tesis. Gracias a sus enseñanzas y a su paciencia.

Al Dr. Carlos Cantú Brito y Antonio Arauz Góngora, ya que gracias a ellos me adentre en el campo de la investigación científica.

A mis compañeros y amigos de especialidad (Mario, Fernando, Luis y Paul), gracias por permitirme gozar de 3 años de intenso aprendizaje de neurología. El nivel académico que los caracteriza es digno de imitar. Gracias.

## Citas

*Para investigar la verdad es preciso dudar, en cuanto sea posible, de todas las cosas*

***René Descartes***

Si tu intención es describir la verdad, hazlo con sencillez y la elegancia déjasela al sastre.

***Albert Einstein***

Lo peor no es cometer un error, sino tratar de justificarlo, en vez de aprovecharlo como aviso providencial de nuestra ligereza o ignorancia.

***Santiago Ramón y Cajal***

## Antecedentes

Desde que la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) fue descrita por Jean Martín Charcot (figura 1) en 1874, esta enfermedad ha sido hasta la fecha enigmática. Lou Gehring, (Figura 2) uno de los más grandes jugadores de Béisbol de todos los tiempos, fue afectado por una enfermedad misteriosa en 1941, que lo hizo retirarse del juego, y murió 2 años después. Desde 1930 a esta enfermedad se le denominó Enfermedad de Lou Gehring en USA, y enfermedad de Charcot en Europa. A pesar del tiempo en que se conoce la enfermedad, los avances en su estudio solo se han desarrollado en las 2 últimas décadas.

Figura 1: Jean Martín Charcot (1825 - 1893). Patólogo, uno de los fundadores de la Neurología. Nació en París. Trabajó en la Salpêtrière, y tuvo a Sigmund Freud entre sus alumnos. Contribuyó de manera notable en el conocimiento de las enfermedades degenerativas y de nervio y músculo.



Figura 2: Lou Gehring. Fue llamado el caballo de acero. Fue primera base de los Yankees desde finales de los años 20 hasta 1939. Pego más de 200 hits en 8 temporadas con un porcentaje de bateo de .340.



Lou Gehring con Babe Ruth



Lou Gehring  
1903 - 1941



Lou Gehring

La Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa mortal que se presenta por destrucción de las motoneuronas superiores e inferiores.(Figura 3) Clínicamente se manifiesta por parálisis progresiva que afecta músculos tanto apendiculares como axiales, produciendo la muerte generalmente por paro respiratorio debido a debilidad de los músculos respiratorios, o por complicaciones como neumonía. Se presenta principalmente en hombres de la 7ª década de la vida y tiene una mortalidad del 50% de los casos a los 3 o 4 años del inicio del padecimiento. La incidencia de la enfermedad es baja y varía entre 1.4 a 2.6 / 100,000 habitantes (1,2,3,4,5) Su prevalencia es 2.7 a 3.1 veces mayor que la incidencia. (5,6,7,8) Se sugiere una susceptibilidad genética en los pacientes que están destinados a desarrollar la enfermedad en un punto particular de su vida, subsecuentemente a un evento inicial aun no determinado.(15)

**Figura 3: Manifestaciones de ELA. Se muestran los datos típicos de atrofia generalizada, este es un dato de afección a las motoneuronas inferiores, y es un dato cardinal de la enfermedad.**



Los factores de riesgo no están bien establecidos, pero se considera que los pacientes con ELA esporádica presentan el antecedente de vivir en medio rural, tomar agua de pozo, haber sufrido un traumatismo severo con fractura de hueso(9,10) o trauma eléctrico,(11,12) haber presentado contacto con órganos fosforados o con metales pesados,(13) y finalmente haber desarrollado actividad física extrema o deportes de alto rendimiento.(9.14)

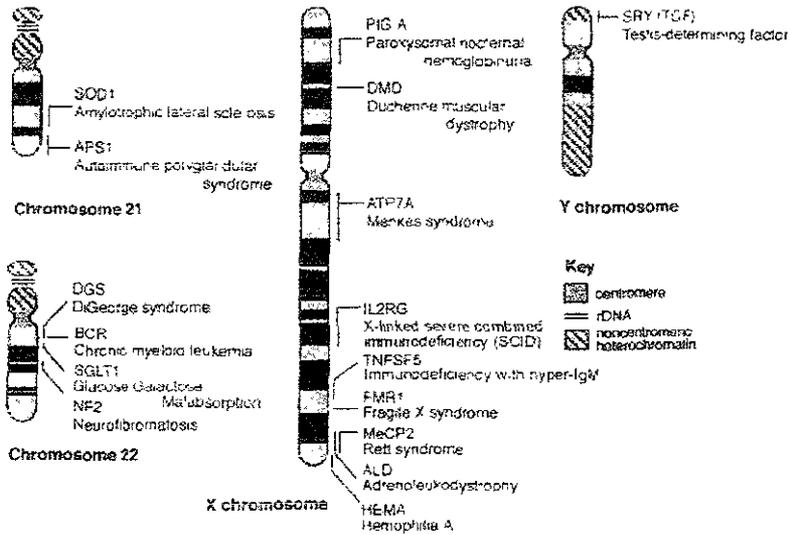
La etiología de la ELA esporádica no se conoce hasta la fecha, pero se han propuesto teorías patogénicas basadas en observaciones de neurobiología básica y hallazgos clínicos (16) Se cree que la ELA esporádica pudiera ser una enfermedad multifactorial, ya que se han encontrado factores genéticos y ambientales. Son múltiples las teorías postuladas en la actualidad acerca de la enfermedad. Una de las

primeras teorías es la de la toxicidad por metales pesados, basada en que la exposición crónica por plomo puede producir un cuadro muy similar a la ELA o una neuropatía motora crónica. Se ha encontrado que los pacientes con ELA tienen una mayor exposición al plomo que sujetos controles, pero al medir los niveles séricos de plomo en ambos grupos no se ha encontrado una diferencia significativa.(17) Además, se ha visto que los pacientes con ELA tienen una mayor frecuencia de exposición a agua de pozo que los pacientes controles, por lo cual se piensa que dichos metales pueden estar presentes en el ambiente. Por otro lado, el tratamiento de los pacientes con ELA esporádica con agentes quelantes de plomo, no ha podido alterar la evolución natural de la enfermedad.(18) Otra teoría es la de las infecciones latentes o por virus. Esta teoría se basa principalmente en los hallazgos encontrados en pacientes con poliomielitis, en la cual se produce una afección de las motoneuronas inferiores, y esto de manera selectiva, por lo cual se cree que algún virus similar al poliovirus puede estar relacionado con la enfermedad, pero hasta la fecha no se ha podido aislar ningún microorganismo.(19) Otra teoría autoinmune, además de la teoría de infecciones virales es la teoría de anticuerpos contra canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Debido a que la liberación de acetilcolina de la placa neuromuscular es dependiente de la activación de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje y un incremento intracelular de calcio transitorio,(20,21) es posible que la liberación de acetilcolina y la degeneración axonal puedan ser el resultado de una activación autoinmune de estos canales, los cuales producen una concentración presináptica e intracelular de  $Ca^{2+}$  elevada.(22) Aparentemente esta respuesta autoinmune es mediada por anticuerpos, aunque su mecanismo exacto de acción no se conoce. Una de las teorías más importantes, y a la cual se le ha dado mucho peso, es a la teoría de la excitotoxicidad por glutamato. Se explica de 2 maneras: en primer lugar se ha encontrado en LCR de pacientes con ELA esporádica niveles de glutamato 3 veces mayores que sujetos control,(23,24) y en segundo lugar, se presenta una teoría más nueva que explica que hay una disfunción en las proteínas transportadoras de glutamato, principalmente las astrocíticas (GLT-1) (EAAT2), lo cual produce una mayor exposición del glutamato a sus receptores dando lugar a una mayor entrada de  $Ca^{2+}$  a la neurona,(25) lo cual ocasiona liberación de enzimas y mediadores químicos que van a producir la muerte neuronal. Finalmente se presentan otros mecanismos de muerte neuronal en ELA, que junto con la teoría del glutamato pueden explicar la

fisiopatología de dicha enfermedad. Estas teorías comentadas a continuación son la base del trabajo a presentar.

La primera de estas teorías esta en relación con la mutación de la enzima SOD1 (superóxido dismutasa tipo 1), una enzima citosólica encargada de convertir el anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), con la finalidad de evitar la acumulación de radicales libres. En 1985(26,27) se inicia el estudio de la mutación de la SOD1 en pacientes con la forma hereditaria de ELA (ELA familiar) (10% a 20%) de las formas de ELA, se encontró que entre el 20% al 30% de las ELA's familiares presentaban una mutación en el gen que codifica la proteína, este gen se encuentra localizado en el cromosoma 21q21.(28) (Figura 4)

Figura 4: Cromosoma 21q21



En base a esto se inicia el estudio en 2 modelos experimentales; el primero (ratón Knockout) suprime la expresión total de la enzima, produciendo una enfermedad de motoneurona relativamente benigna. Estos animales solo presentan una disminución en la fuerza muscular, y la desarrollan en el transcurso de varios años, de manera que la enfermedad producida no es mortal. Posteriormente se desarrolla un

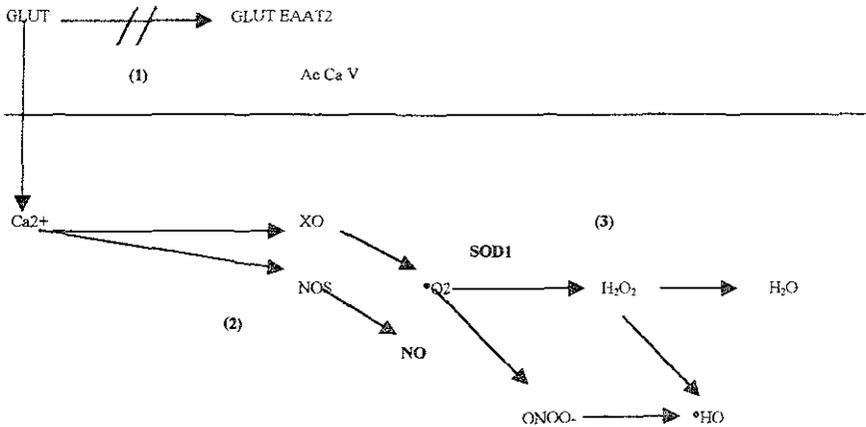
modelo transgénico en el cual se puede reproducir la mutación en los ratones, de esta manera se produce una enfermedad de las neuronas motoras fulminante y mortal, muy similar a la enfermedad humana (29,30,31) Se postula que la disminución cuantitativa en la enzima no es la responsable de la enfermedad, sino por el contrario, la presencia de una enzima mutante, presenta una función anormal lo cual produce una exposición de los metales de la enzima (Cu/Zn) para que se produzca una mayor conversión de anión superóxido a peróxido de hidrógeno y de esta manera se produzca hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) en grandes cantidades. En base a esto, se inician estudios en las formas esporádicas en busca de una disminución de la enzima, no encontrando tal. Por lo cual se postula que al igual que la forma familiar, algún cambio en la configuración de la enzima sea la causante de la enfermedad. En la forma esporádica de ELA, se cree que no se presenta una mutación enzimática por factores genéticos, pero este cambio configuracional puede ser producido por la edad del paciente, se piensa que a mayor edad, la SOD1 presenta un cambio similar al cambio presentado en la enzima mutante de las formas familiares.(32) De esta manera, al presentarse una forma mutante de la enzima, la actividad enzimática normal estará disminuida, el resto de la actividad enzimática debe ser una actividad anormal, lo cual no permite su medición por pruebas habituales en donde se detecta actividad enzimática.

La otra teoría involucra al óxido nítrico (NO). Se piensa que bajo determinadas situaciones, como la exposición de la célula al  $\text{Ca}^{2+}$ , producido por una mayor cantidad de Glutamato, se presenta una mayor expresión de la sintetasa del óxido nítrico (NOS), ocasionando una mayor producción de NO que convierte anión superóxido a peroxinitrito ( $\text{NOO}^{\cdot}$ ).(33) Una mayor concentración de NO produce una mayor concentración de sus metabolitos estables nitratos y nitritos. Por esto, su elevación es un fiel reflejo de la mayor producción de NO en el organismo.

En base a las 3 últimas teorías, se puede sustentar una explicación de la fisiopatología de la ELA. Inicia la vía en el Glutamato, esto produce un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  con un aumento en la NOS y mayor cantidad de NO que reacciona con  $\cdot\text{O}_2$  formando los radicales peroxinitrito. Por otro lado, la actividad anormal de la SOD1 ocasiona una mayor acumulación de radicales  $\cdot\text{O}_2$  en el medio, y en consecuencia se

forma un exceso de radicales libres hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). De esta manera, el aumento del  $\cdot\text{OH}$  por las 2 vías produce el daño y la muerte celular. (figura 5)

Figura 5. La figura No 5 muestra el proceso que sigue la cascada de estrés oxidativo en los pacientes con ELA. Muestra los 3 procesos principales. 1) aumento de glutamato extracelular, 2) la formación de peroxinitrito vía óxido nítrico, y 3) la formación de hidroxilo vía SOD1.



GLUT EAAT2	Transportador astrofítico de Glutamato.
Glu	Glutamato
Ac Ca V	Anticuerpo contra canales de Ca voltaje dependientes.
Ca	Calcio
XO	Xantina oxidasa
NOS	Oxido nítrico sintetasa
NO	Oxido nítrico
SOD1	Superóxido dismutasa
O2	Ion Superóxido
H2O2	Peróxido de Hidrógeno
ONOO	Peroxinitrito
H2O	Agua
HO	Radical Hidroxilo

## TEORIAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

### Glutamato

Bajo condiciones normales, cuando la terminal presináptica es despolarizada, el glutamato es liberado vía un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Difunde dentro de la hendidura sináptica en donde puede activar receptores específicos. El glutamato es eliminado de la hendidura sináptica por medio de transportadores de glutamato localizados en los astrocitos o en las neuronas. Los transportadores de glutamato son



elevación en la hendidura sináptica del mismo lo que ocasiona neurotoxicidad. En estudios de pacientes con ELA, se ha encontrado una disminución en la inmunorreactividad para la proteína GLT-1 en la corteza motora y en la médula espinal. Por estos estudios se sugiere que la pérdida de función en pacientes con ELA puede ser mediado por pérdida selectiva del transportador de glutamato astrocítico GLT1.(25)

### **Superoxido Dismutasa 1.**

Las superóxido dismutasas son un grupo de enzimas que catalizan la conversión del ión superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ) a peróxido de hidrógeno y oxígeno. La SOD provee defensa celular en contra del  $\cdot\text{O}_2$  y sus derivados tóxicos. Hay 3 isoformas humanas de SOD: La superóxido dismutasa citosólica dependiente de Cu/Zn (SOD1), la mitocondrial (SOD2), y la extracelular (SOD3). Cada enzima se encuentra codificada en un gen diferente, el gen identificado en la actualidad es el 21q21.

Cada molécula de SOD1 es una proteína monomérica de 153 Aa y 16 Kd que contiene un átomo de Cu y un átomo de Zn. Cada  $\cdot\text{O}_2$  es unido al Cu formando un dímero. La arginina en posición 143 estabiliza la posición del  $\cdot\text{O}_2$  en relación al átomo de Cu. Este proceso de dismutasa se realiza a una velocidad de  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ .  $\cdot\text{H}_2\text{O}_2$  es el producto final de la reacción de dismutasa, este producto inactiva la SOD1.(73)

En 1993 Rosen (55) encontró que algunos casos de pacientes con ELA familiar presentaban mutación en la SOD1. A pesar de que solo el 10% de los casos de ELA familiar resultaron en la mutación, los hallazgos clínicos y patológicos asociados a la mutación de la SOD1 sugirieron que los procesos bioquímicos que conducen al daño y muerte de las motoneuronas en pacientes con ELA familiar, son muy similares a los que ocurren en ELA esporádica.(74) Al inicio se pensó que la pérdida de la enzima o una disminución en su función producían la ELA familiar, pero actualmente se habla de una ganancia de función de la enzima.

Se han propuesto muchos mecanismos a través de los cuales la expresión de la SOD1 mutante puede producir una degeneración crónica de las motoneuronas. Desde que los estudios en animales y en humanos sugirieron la presencia de

anormalidades en los neurofilamentos, es posible que proteínas críticas, como proteínas de los neurofilamentos, puedan estar dañadas por algún mecanismo involucrado en la mutación de la SOD1. Uno de estos mecanismos propuestos por Beckman,(75) involucra la formación de nitrotirosina derivada de la catalización por medio de la enzima mutante.(73) Otro posible mecanismo por el cual la enzima mutante puede producir degeneración de las motoneuronas, es vía unión anormal con los metales de la enzima. Mediciones directas de purificados de la SOD1 Cu/Zn han mostrado una disminución en la unión a metales.(76) Un tercer mecanismo por el cual la SOD1 mutante puede producir muerte neuronal es por medio de alteración configuracional de la enzima. Aparentemente la enzima presenta alteraciones en la unión a proteínas, en la solubilidad, desnaturalización y en su degradación. Esto da como resultado un análogo con la hemoglobina S mutante, por lo cual la enzima mutante tiene la propiedad de precipitarse produciendo cuerpos de inclusión y posteriormente la muerte de las neuronas.(74)

#### **Neurotoxicidad por estrés oxidativo y el papel del óxido nítrico.**

El cerebro y médula espinal humanas adquieren prácticamente toda su energía del metabolismo oxidativo de la mitocondria, y de la cadena respiratoria. Durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria, el oxígeno es reducido a agua por la citocromo oxidasa, y el ATP es generado. Como los electrones de alta energía se mueven a través de la cadena de transporte de electrones, un porcentaje pequeño (<50%) se unen al oxígeno para formar radicales libres (77)

Cuando el anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ) reacciona con el óxido nítrico, se forma un radical altamente difusible llamado peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot$ ). Este metabolito es un oxidante poderoso que puede causar muerte neuronal. Aparentemente en los pacientes con ELA se presenta un aumento de la sintetasa del óxido nítrico dando una mayor conversión de  $\text{ON}$  a  $\text{ONOO}\cdot$ . La elevación de la óxido nítrico sintetasa durante la excitotoxicidad, Gesta dada por un flujo de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hacia la célula mediada por la activación de los receptores de aminoácidos excitatorios como el glutamato. Además, el  $\text{ONOO}\cdot$  puede reaccionar con la SOD1 formando de esta manera nitronio ( $\text{NOO}^+$ ) el cual forma residuos de tirosina para formar posteriormente nitrotirosina produciendo de este modo daño neuronal.(77)

## **Justificación**

1. No se ha establecido la base fisiopatología de la ELA, actualmente se cuenta con múltiples teorías, pero ninguna por separado satisface totalmente la fisiopatología de la ELA.
2. No se ha establecido si hay asociación entre la ELA esporádica y la actividad de la SOD1.
3. Nunca se ha determinado la concentración de nitratos en LCR en pacientes con ELA esporádica.
4. No se conoce realmente si los factores de riesgo descritos con anterioridad se presentan con mayor frecuencia en los pacientes con ELA esporádica que en los sujetos sin ELA esporádica.

## **Hipótesis**

La actividad de la enzima superóxido dismutasa 1, mas que los niveles de la enzima en líquido cefalorraquídeo (LCR) se encuentra disminuida en pacientes con ELA esporádica.

Los niveles de nitratos como metabolismo estable del óxido nítrico, se encuentran elevados en LCR en pacientes con ELA esporádica

Los factores de riesgo reportados en la literatura se presentan con mayor frecuencia en pacientes con ELA esporádica que en sujetos control.

## Objetivos

1. Cuantificar la actividad de la enzima SOD1 en LCR de pacientes con ELA esporádica.
2. Cuantificar los niveles de nitratos en LCR de pacientes con ELA esporádica.
3. Cuantificar los niveles de nitratos y la actividad de la enzima SOD1 en LCR en sujetos control.
4. Establecer la asociación entre ELA esporádica y los diversos factores de riesgo para la enfermedad.

## Pacientes y métodos

Se realizó un estudio de casos y controles en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "MVS" de México en un periodo de tiempo comprendido entre el 1° de Marzo de 1999 al 1° de Noviembre del 2000. Se calculo una muestra de 18 casos en base a la desviación estándar de estudios de la literatura y a un estudio piloto realizado en nuestro instituto. Se calculo la muestra buscando una diferencia de 30% en unidades de actividad de SOD1 y 2 veces el valor de nitratos en LCR

Los pacientes fueron pareados por edad  $\pm$  3 años, género y los controles fueron captados dentro de las 4 semanas siguientes al ingreso del control.

Los casos tenían que cumplir con los siguientes criterios de inclusión: 1) Criterio de ELA definida propuesta por los criterios del Escorial (34) para ELA esporádica (Anexo 1 y 2), los criterios incluyen. presencia de síntomas de neurona motora superior y neurona motora inferior en 3 de 4 regiones (bulbar, cervical, torácica, lumbosacra), además de datos de denervación activa en electromiografía (EMG). Los casos de ELA esporádica posible y probable no fueron incluidos en el estudio, 2) Aceptaran participar en el estudio y firmaran consentimiento firmado por escrito (Anexo 5), 3) que la muestra de LCR no mostrara datos de inflamación. Los criterios de exclusión en el estudio fueron que los pacientes no presentaran criterios de ELA definida como lo indica el criterio del Escorial, que los estudios realizados en los pacientes (resonancia magnética nuclear, perfil hormonal, electromiografía, punción lumbar) fueran indicativos de otra patología. El único criterio de eliminación fue que el paciente decidiera dar por terminado el estudio y que no quisiera participar en el análisis de los datos.

Para la selección de controles se tomo a pacientes con enfermedad neurológica diferente a la degenerativa o inflamatoria, en los cuales la punción lumbar (PL) se encontrara dentro de límites normales, y que aceptaran participar en el estudio dando consentimiento firmado por escrito. (anexo 5)

A todos los casos (anexo 4) se les realizaron estudios de rutina (biometría hemática, química sanguínea, electrólitos séricos, tiempos de coagulación, pruebas de función hepática), perfil hormonal, punción lumbar, y pruebas de electrofisiología (velocidades de conducción nerviosa motora y electromiografía). A los controles se les realizaron estudios de rutina, perfil hormonal y punción lumbar. A todos los sujetos (casos y controles) se les valoraron los factores de riesgo (tomar agua de pozo, vivir en medio rural, actividad física extrema, traumatismo mecánico o eléctrico, intoxicación con metales pesados u órgano-fosforados) conocidos para ELA esporádica para buscar alguna diferencia entre grupos.

Los casos fueron clasificados por los criterios del Escorial(34) (definidos anteriormente) y por la escala funcional de ELA,(15,35) (Anexo 3) la cual califica 10 apartados de 0 a 4 puntos cada apartado, en donde 0 es la máxima afección y 4 es el sujeto con actividad normal (1 lenguaje, 2 salivación, 3 deglución, 4 escritura, 5 alimentación, 6 actividad al vestirse, 7 actividades en cama, 8 marcha, 9 subir escaleras, y 10 respiración).

Se obtuvieron 5 cc de LCR entre 8:00 AM y 9:00 AM según los lineamientos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "MVS" de México (INNNMVS); un cc se utilizó al momento de la toma de la muestra para analizar el citoquímico (células, glucosa y proteínas), los 4 cc restantes fueron congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  en tubos de plástico hasta el momento del análisis. La actividad de la SOD1 fue medida por medio de un método de espectrofotometría por XO (xantino oxidasa),(36) y los niveles de nitratos fueron medidos por medio de un método de cromatografía líquida de alta resolución con detectores electroquímicos de UV (luz ultravioleta).(37) Se decidió realizar medición de nitratos y no nitritos ya que en el método que utilizamos los nitritos se oxidan con gran rapidez a nitratos haciendo difícil su cuantificación.

**Cromatografía líquida de alta resolución para el cálculo de la concentración de nitratos.** Se utilizó para el análisis un total de 30 a 50 mcl de LCR. Se utilizó un sistema de entrega de 10 solventes (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) equipado con una válvula de inyección (7125 Rheodyne, Cotati, CA, USA). Se operó con un detector UV LC-90 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) a 230 nm. También se utilizó un

detector electroquímico LC-4B/17 AT para el sistema bioanalítico (West Lafayette, IN, USA) con un electrodo de carbón. El potencial aplicado fue de 0.8 V. El potencial de trabajo se escogió después de la construcción de un voltamograma. La curva se realizó después de marcar las intensidades pico que correspondían a la inyección de los nitratos en comparación de diversos valores de un potencial aplicado de 0.4 V a 1.1 V. La columna fue una de fase reversa C-8 (tamaño de partículas de 5µm, 250mm x 4.6 mm I.D) (Beckman Instruments, Kelsterbach, Germany) conectado a una precolumna (C-18, 5 mm. 1 cm). La fase móvil fue de 5 mM octilamina ajustada a un pH de 6.40 con ácido fosfórico. Los resultados de los análisis se expresaron en µg.

**Metodo para la obtención de la actividad de la Superóxido Dismutasa 1.** La actividad de la SOD1 fue analizado por una variación del método espectrofotométrico descrito por Flohé y ötting. (71) Se agrego el LCR en solución de 20 mM de bicarbonato de sodio ( $\text{HCO}_3$ ), 0.02 Triton X-100, pH 10.2 a una solución que contenía 10 µM de ácido de sodio, 100 µM de xantina, 10 VM de citocromo C reducido, y 1 mM de EDTA en 20 mM de bicarbonato de sodio, 0.02% Triton X-100, pH 10.2. El método se inicio con la adición de xantino oxidada y posteriormente se analizó mediante la medición de cambios en la absorbencia a 560. La actividad de la SOD1 se calculo como la diferencia entre la actividad total de la enzima menos la actividad inhibida por 5 mM de cianido de sodio. Se expresaron los resultado como unidades de actividad enzimática.

## **Consideraciones éticas**

El actual proyecto de investigación se apega de manera estricta a los lineamientos de la declaración internacional de Helsinki, en su versión revisada por la 29ª Asamblea Médica Mundial (Helsinki II), así como de la ley de salud y las leyes de México, y de manera específica, al reglamento para investigación clínica publicado por la división de investigación clínica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron informados del procedimiento del estudio, se les informó del procedimiento de punción lumbar, y se les indicaron las posibles complicaciones inherentes al procedimiento. Se pidió consentimiento informado por escrito.

## **Análisis estadísticos**

Para el análisis de los casos y controles se utilizaron medidas de tendencia central. Se utilizó prueba de  $X^2$  para variables nominales, y para variables ordinales no paramétricas se utilizó la prueba de t de students y Mann-Whitney. Se utilizó razón de momios para los diversos factores de riesgo de la enfermedad. Finalmente se realizó una correlación de Spearman para identificar si había alguna correlación entre las variables electrofisiológicas y las variables biológicas medidas en el estudio. Se consideró como significativo una  $p < 0.05$ .

## Resultados

Se estudiaron 18 pacientes con ELA esporádica y 18 controles con enfermedades neurológicas diferentes a las degenerativas o inflamatorias (la mayoría de los controles tenían cefalea en estudio que posteriormente se corroboró como diagnóstico cefalea tensional, otros pacientes tenían como diagnóstico Neurocisticercosis en fase inactiva y sin tratamiento, esclerosis múltiple en remisión) (Tabla 1). Las características demográficas y los factores de riesgo de casos y controles se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. La tabla No 1 muestra el total del grupo control. Se presentan 10 pacientes con cefalea tensional, 5 pacientes con neurocisticercosis en fase inactiva por más de 1 año, los cuales ya se encontraban sin tratamiento médico por más de 6 meses, y 3 pacientes con esclerosis múltiple en remisión por más de 1 año, los cuales se encontraban sin tratamiento médico por más de 6 meses.

No de paciente	Edad	Sexo	Diagnóstico
1	20	F	Cefalea tensional
2	65	M	Cefalea tensional
3	37	F	Cefalea tensional
4	24	F	Cefalea tensional
5	28	F	Cefalea tensional
6	51	F	Cefalea tensional
7	66	M	Cefalea tensional
8	54	F	Cefalea tensional
9	26	F	Cefalea tensional
10	44	F	Cefalea tensional
11	41	M	Neurocisticercosis
12	44	M	Neurocisticercosis
13	40	M	Neurocisticercosis
14	60	M	Neurocisticercosis
15	30	F	Neurocisticercosis
16	30	F	Esclerosis múltiple
17	43	F	Esclerosis múltiple
18	48	M	Esclerosis múltiple

Tabla 2. En la tabla No 2 se muestran los factores demográficos de casos y controles. Ambos grupos son homogéneos en cuanto a edad y género. Los únicos datos positivos fueron el antecedentes de tomar agua de pozo, y el antecedente de realizar actividad física extrema.

	ELA (n=18)	Control (n=18)	OR (IC 95%)	p
EDAD	48.9 ± 10.3	45.9 ± 8.3		0.544
SEXO				
Masculino	7 (37.9%)	5 (27.8%)		0.360
Femenino	11 (61.1%)	13 (72.2%)		0.360
MEDIO				
Urbano	14 (77.8%)	15 (83.3%)		
Rural	4 (22.2%)	3 (16.7%)		0.500
APNP				
Agua de pozo	8 (44.4%)	2 (11.1%)	1.86 ± 1.74 (0.12 – 3.6)	<b>0.030</b>
Organo fosforados	2 (11.1%)	3 (16.7%)	0.626 ± 2.95 (-2.32 – 3.57)	0.501
APP				
Actividad física extrema	7 (37.9%)	1 (5.6%)	10.8 ± 2.38 (1.06 – 5.8)	<b>0.020</b>
Trauma mecánico	8 (44.4%)	6 (33.3%)	1.6 ± 1.27 (0.36 – 1.56)	0.344
Distiroidismo	1 (5.6%)	0 (0%)	N/D	0.500
Diabetes	2 (11.1%)	1 (5.6%)	2.12 ± 0.75 (-0.53 – 2.03)	0.500
Hipertensión	4 (22.2%)	2 (11.1%)	2.29 ± 0.83 (-0.05 – 1.71)	0.500

La edad de los pacientes con ELA fue de 48.9±10.3 y la de los controles fue de 45.9±8.3 (p=0.34), predominó el sexo femenino en ambos grupos. 11 (61.1%) del grupo de ELA y 13 (72.2%) del grupo control (p=0.36). En ambos grupos predominó el medio urbano: 14 (77.8%) en el grupo de ELA y 15 (83.3%) en el grupo control (p=0.50). De los diversos factores de riesgo estudiados, solo 2 fueron significativos para el grupo de ELA. El antecedente de ingesta de agua de pozo en 8 (44.4%) casos contra 2 (11.1%) de los controles con una p=0.030 [OR 1.86±1.74 (0.12 – 3.6)] y el antecedente de actividad física intensa en 7 (37.9%) casos contra 1 (5.6%) de los controles con una p=0.020 [OR 10.8±2.38 (1.06 – 5.8)].

Los estudios realizados en los pacientes no mostraron significancia estadística, solo los relacionados con velocidades de conducción motora (Tabla 3)

Tabla 3. La tabla No 3 muestra los paraclínicos estudiados en los pacientes, mostrando que ambos presentaban perfil tiroideo y citoquímico de punción lumbar dentro de la normalidad. La única diferencia significativa fue el resultado de las amplitudes de las velocidades de conducción nerviosa motora, las cuales mostraron una clara disminución en los pacientes con ELA.

	ELA	CONTROL	p
<b>P. TIROIDEO</b>			
T3	3.50 ± 0.97	3.6 ± 2.8 - 8.2	0.694
T4	15.98 ± 3.04	16.45 ± 9.1 - 23.8	0.554
TRH	2.92 ± 4.89	2.54 ± 0.49 - 4.6	0.738
<b>P. LUMBAR</b>			
Celulas	1 ± 1.28	1.11 ± 1.45	0.243
Linfocitos	36% (0 - 100)	18% (0 - 100)	0.098
Glucosa	62.83 ± 11.82	62.61 ± 19.48	0.967
Proteinas	43.72 ± 10.74	37.89 ± 10.36	0.106
<b>AMPLITUDES</b>			
Cubital derecho	4.23 ± 3.39	16 ± 2	< 0.001
Cubital izquierdo	3.41 ± 2.79	16 ± 2	< 0.001
Mediano derecho	3.25 ± 2.68	16 ± 2	< 0.001
Mediano izquierdo	3.13 ± 2.23	16 ± 2	< 0.001
Peroneo derecho	3.37 ± 3.24	12 ± 2	< 0.001
Peroneo izquierdo	4.36 ± 4.03	12 ± 2	< 0.001

Estos mostraron una marcada disminución en la amplitud de los potenciales en los pacientes con ELA en comparación con los controles. La evolución de los pacientes con ELA en promedio fue de 18 meses, y la escala funcional de ELA fue de 26.9 puntos en promedio.

Se dividió el grupo de pacientes con ELA por género para determinar si había alguna diferencia entre los parámetros estudiados (factores demográficos y parámetros de laboratorio), encontrando que solo el antecedente de actividad física intensa era mas frecuente en el grupo de pacientes masculinos con ELA (tabla 4 y 5)

Los resultados de la actividad de la SOD1 mostraron una clara disminución en la actividad de la enzima en los pacientes con ELA en comparación con los controles. La actividad de la enzima para los pacientes con ELA fue de  $28.75 \pm 1.25$  unidades de actividad y la de los controles fue de  $34.45 \pm 2.00$  unidades de actividad con una  $p=0.029$  (figura 7). Los niveles de nitratos también mostraron un claro incremento para los pacientes con ELA en comparación con los controles. Los pacientes con ELA tenían niveles de  $224.32 \pm 39.36$  mcg/ml, en tanto que los controles presentaron niveles de  $88.70 \pm 17.74$  mcg/ml con una  $p < 0.001$  (figura 8).

Tabla 4. La tabla No. 4 muestra los parámetros principales estudiados en los pacientes con ELA. La tabla muestra que el grupo es homogéneo cuando se divide por género, solo el antecedente de actividad física extrema fue mas importante en el género masculino.

	TOTAL	FEMENINO	MASCULINO	OR	p
EDAD	48.9 ± 10.3	51.30 ± 9.88	45.14 ± 10.51		0.222
ANTECEDENTES					
Alergias	4 (22.2%)	2 (50%)	2 (50%)	ND	0.515
Agua de Pozo	8 (44.4%)	4 (50%)	4 (50%)	ND	0.352
Actividad física Extr	7 (37.9%)	2 (28.6%)	5 (71.4%)	0.16 ± 1.83 (-1.53 - 5.19)	0.039
EVOLUCION	18 (3 - 122)	15 (3 - 58)	24 (8 - 122)		0.217
ESCALA	26.89 ± 8.57 (12 a 40)	25.73 ± 9.11	28.71 ± 7.95		0.488
INICIO SINTOMAS					
Bulbar	3 (16.7%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)		
Braquial	9 (50%)	7 (77.8%)	2 (22.2%)		
Crural	6 (33.3%)	2 (33.3%)	4 (66.7%)		0.219
TIPO ESCLEROSIS					
Esclerosis lateral	18 (100%)	11 (88.9%)	7 (11.1%)		0.751

Tabla 5. La tabla No 5 muestra los estudios paraclínicos realizados en los pacientes con ELA. nuevamente la distribución es por género y no muestra diferencias significativas en los parámetros estudiados.

	TOTAL	FEMENINO	MASCULINO	p
PARACLINICOS				
P. Tiroideo				
T3	3.50 ± 0.97	3.55 ± 1.04	3.47 ± 0.99	0.890
T4	15.98 ± 3.04	14.76 ± 2.64	17.20 ± 3.14	0.178
TRH	2.92 ± 4.89	4.22 ± 6.95	1.63 ± 0.61	0.385
LCR				
Celulas	1 ± 1.28	0.91 ± 1.22	1.14 ± 1.46	0.718
Linfocitos	36% (0 - 100)	18% (0 - 100)	18% (0 - 94)	0.772
Glucosa	62.83 ± 11.82	64.45 ± 14.57	60.29 ± 5.44	0.482
Proteinas	43.72 ± 10.74	42.27 ± 10.39	46.00 ± 11.69	0.489
Amplitudes				
Cubital derecho	4.23 ± 3.39	3.28 ± 2.54	5.72 ± 4.19	0.142
Cubital izquierdo	3.41 ± 2.79	2.87 ± 2.43	4.27 ± 3.29	0.313
Mediano derecho	3.25 ± 2.68	2.54 ± 2.16	4.38 ± 3.20	0.164
Mediano izquierdo	3.13 ± 2.23	2.57 ± 2.10	4.02 ± 2.29	0.188
Peroneo derecho	3.37 ± 3.24	2.77 ± 2.50	4.33 ± 4.19	0.336
Peroneo izquierdo	4.30 ± 4.03	3.75 ± 3.62	5.31 ± 4.73	0.440

Finalmente se realizó un modelo de correlación de Spearman, para ver la correlación entre los parámetros de laboratorio y los parámetros bioquímicos

estudiados. Se encontró una buena correlación entre los niveles de nitratos y la actividad enzimática de la SOD1 en el grupo de ELA (CC -0.667 p=0.025) (Figura 9).

Figura 7. La figura No 7 muestra una clara disminución en la actividad enzimática de la Superóxido dismutasa para los pacientes con ELA (gráfica de la derecha). Los valores son expresados en unidades de actividad.

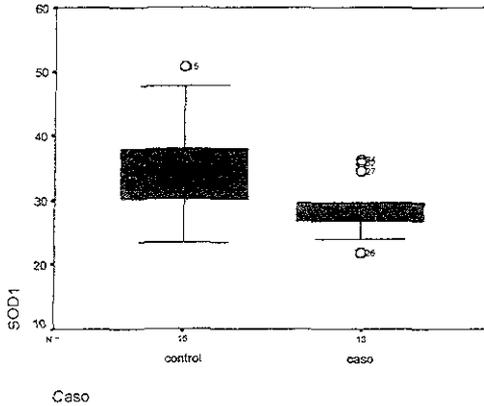
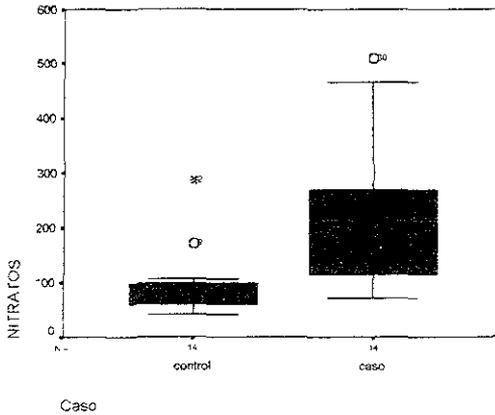


Figura 8. La figura No 8 muestra un claro aumento en la concentración de nitratos en los pacientes con ELA (gráfica de la derecha). Los valores son expresados en mcgr/ml.



De los parámetros de laboratorio estudiados, solo se encontró una buena correlación entre las amplitudes de las velocidades de conducción motoras para los miembros superiores, indicando que a mayor concentración de nitratos y menor actividad de la SOD1, las velocidades de conducción disminuyen. Las correlaciones significativas con nitratos fueron: para amplitud del nervio cubital derecho (CC -0.618 p<0.001), para la

amplitud del nervio cubital izquierdo (CC -0.612 p<0.001), para la amplitud del nervio mediano derecho (CC -0.639 p<0.001) y para el nervio mediano izquierdo (cc -0.670 p<0.001) (figuras 10 y 11)

Figura 9. La figura No 9 muestra la relación inversa que guarda la concentración de óxido nítrico con la actividad de SOD1. A mayor concentración de nitratos, menor actividad de la enzima SOD1. (CC -0.667 p=0.025)

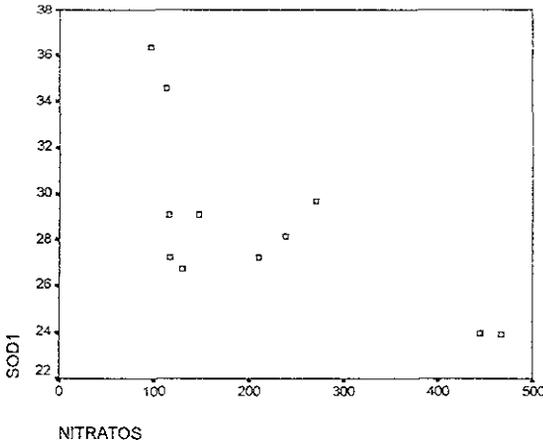
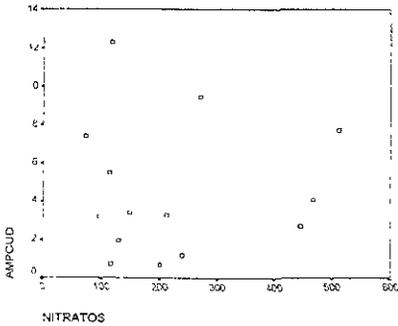
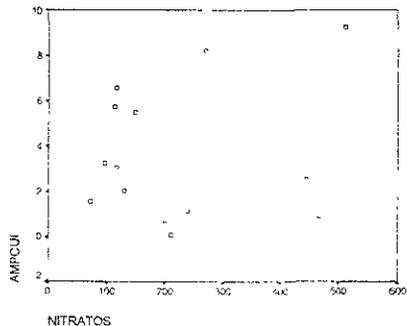


Figura 10. La figura No 10 y 11 muestran la relación directa entre las amplitudes en las velocidades de conducción nerviosa motora y la concentración de nitratos (mcg/ml) en pacientes con ELA. Se muestra que a mayor concentración de nitratos, las amplitudes disminuyen, esto tanto para el nervio cubital derecho, cubital izquierdo, mediano derecho v mediano izquierdo.

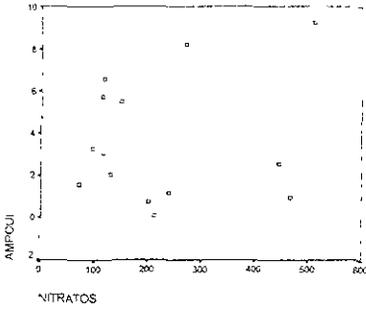


**Nervio cubital derecho**

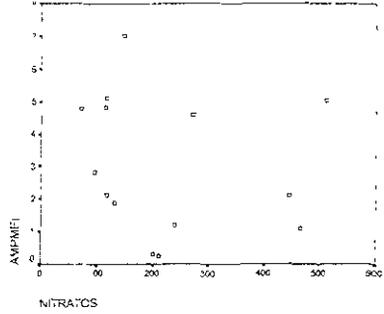


**Nervio cubital izquierdo**

Figura 11



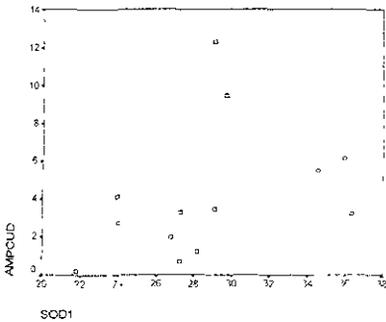
**Nervio mediano derecho**



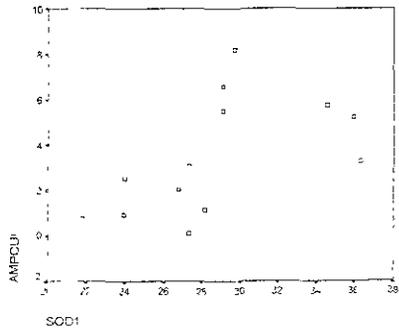
**Nervio mediano derecho**

Las correlaciones significativas para actividad de SOD1 fueron: con amplitud del nervio cubital derecho (CC 0.489 p=0.008), para la amplitud del nervio cubital izquierdo (CC 0.511 p=0.005), para la amplitud del nervio mediano derecho (CC 0.482 p=0.009), y para la amplitud del nervio mediano izquierdo (CC 0.511 p=0.006). (Figuras 12 y 13)

Figura 12. Las figuras 12 y 13 muestran la relación inversa que guardan las amplitudes de las velocidades de conducción nerviosa motora y la actividad de la enzima Superóxido dismutasa 1. En los 4 gráficos se muestra que al disminuir la actividad de la SOD1 (unidades de actividad), las amplitudes de las velocidades disminuyen para los nervios cubital y mediano.

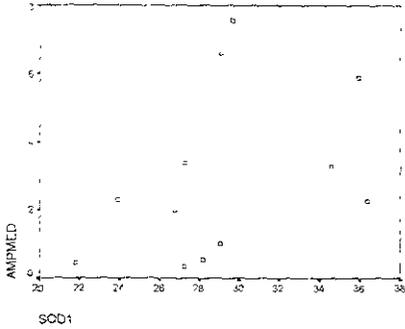


**Nervio cubital derecho**

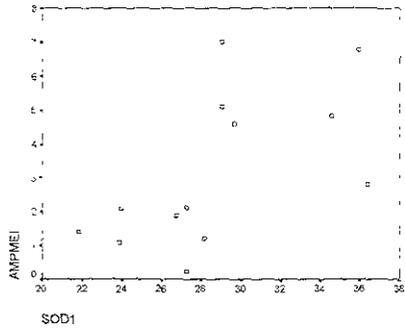


**Nervio cubital izquierdo**

Figura 13



**Nervio mediano derecho**



**Nervio mediano izquierdo**

No se encontró correlación entre las escala clínica utilizada en los pacientes con ninguna de las variables estudiadas. Los resultados se obtuvieron para nitratos (CC -0.256 p=0.378), SOD1 (CC 0.268 p=0.377) y para las velocidades de conducción motora (CC 0.381 p=0.118).

## **Discusión**

En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "MVS" atendemos un total de 9 a 10 pacientes con ELA esporádica por año, con un promedio de edad de 43.84 años (femenino 46.56 años y masculino 41.13 años). (dato no publicado) En nuestra serie encontramos una edad promedio de 48.9 años para los pacientes con ELA esporádica, esto es ligeramente menor que lo reportado en la literatura mundial que estima una edad pico entre los 55 a los 75 años. (38,39,40) La edad de inicio temprana en nuestro paciente se ha corroborado en México en el estudio de Otero, Arriada y Corona los cuales encontraron una edad de inicio de 48 años en población Mexicana, datos similar a lo encontrado por nosotros.(70) Otro dato interesante es que la relación hombre:mujer en nuestra serie fue de 1.56 con predominio en mujeres, mientras que en los reportes de la literatura mundial esta relación se encuentra invertida 1.5 a 2.5 con predominio en hombres.(40,41,42) Estos datos pueden ser explicados por el tamaño de la muestra. En otras series pequeñas como la de Norris(43) y Radhakrishnan(44) se han encontrado edades pico en pacientes menores de 60 años. Potemkowski(49) en un estudio de 49 pacientes con ELA esporádica encontró una edad promedio de 53.2 años, dato mas cercano a los resultados de nuestra serie.

Hasta la fecha hay pocos artículos que hablen acerca de los factores de riesgo asociados a ELA esporádica, de estos, solo 3 factores de riesgo han sido asociados de manera importante a ELA en estudios controlados (Actividad física extrema, Trauma mecánico con fractura de hueso y exposición a tóxicos y solventes).(10,38,45) En nuestra serie solo el antecedente de realizar actividad física extrema fue significativo. En las series de Felmus, Chancellor, y Granieri los riesgos relativos para actividad física extrema varían entre 2.0 a 2.6, en tanto que en nuestra serie el riesgo relativo fue de 10.8. A pesar de que otras series han reportado riesgos relativos que van desde un 2.3 a un 15.0 para trauma mecánico,(38,46) y de un 2.2 a 5.0 para tóxicos y solventes,(47,48) en nuestra serie solo encontramos 1 paciente con ELA esporádica con antecedente de trauma mecánico severo, y 2 pacientes con antecedente de exposición a Organos fosforados

Es bien conocido que el 20% de la forma familiar de ELA que expresa el 5% al 10% de todas las formas de ELA, se encuentra producido por la mutación de la enzima superóxido dismutasa dependiente de cobre/Zinc (Cu/Zn). Este tipo de mutación en la enzima se transmite de manera autosómica dominante. La mutación se encuentra localizada en el cromosoma 21q22.1-22.2.(43,50-56) Esta misma alteración enzimática, pero producida básicamente por cambio configuracional de la enzima debido a un proceso de envejecimiento ha sido estudiado poco en la forma esporádica de ELA. En nuestro estudio encontramos una clara diferencia en la actividad de la enzima comparando casos contra controles. En los pacientes con ELA, la actividad de la enzima dependiente de Cu/Zn se encontraba disminuida, en tanto que en los controles se encontraba la actividad dentro los rangos normales. No encontramos ningún estudio que realizara mediciones de la actividad enzimática en LCR, los pocos estudios relacionados con el tema hacen mediciones en eritrocitos. Estudios previos realizados por Sneadal 1998 y Tórsdóttir 1999 han encontrado disminución en la actividad enzimática de la SOD1 en pacientes con enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson respectivamente,(57,58) debido a estos hallazgos se decide realizar estudios en pacientes con ELA esporádica. Tórsdóttir en Septiembre del 2,000(59) publica un artículo de 14 pacientes (11 ELA esporádica y 3 con ELA familiar), en donde encuentra una diferencia marginal en la actividad de la enzima SOD1, con una disminución en su actividad en los pacientes con ELA tanto esporádica como familiar. Nishiyama en 1997 estudia la expresión del gen de la SOD1 humana en pacientes con ELA esporádica y familiar, y los compara con sujetos control. Este autor encuentra por medio de una técnica de hibridación in situ que los pacientes con ELA tanto esporádica como familiar tenían niveles mas disminuidos de RNA mensajero en las motoneuronas dañadas que los sujetos control, de esta manera postula que si hay una relación entre la SOD1 y la patogénesis de ELA esporádica.(60) Por otro lado Shaw en 1998 encontró que el 3% de sus pacientes con ELA esporádica presentaban mutaciones puntuales en el gen de la SOD1,(61) en tanto que Jackson(62) solo encontró 4 pacientes de 155 casos con ELA esporádica con alguna mutación en el gen de la SOD1, haciendo esta relación menos estrecha. Las mutaciones responsables de estos casos se han localizado en los exones 3 y 4 del gen de la SOD1.

La relación entre nitratos, óxido nítrico y ELA esporádica es aun mas difícil de establecer, hasta la fecha solo se cuenta con teorías que no han podido establecer una relación directa entre estos marcadores de estrés oxidativo y ELA esporádica. En nuestro trabajo encontramos que la concentración de nitratos (como marcador de estrés oxidativo mediado por óxido nítrico), se encuentra elevada en los pacientes con ELA esporádica en comparación con el grupo control. En otros estudios como el de Beal 1997, se ha encontrado que el estrés oxidativo derivado de la reacción del anión superóxido con el óxido nítrico se encuentra elevada. Esta reacción produce peroxinitrito el cual es altamente dañino. Este autor al estudiar las motoneuronas de la médula espinal torácica y lumbar de pacientes con ELA esporádica, demostró que mediante la medición de 3-Nitrotirosina se puede determinar el daño oxidativo mediado por peroxinitrito en pacientes con ELA esporádica.(63) Tohgi 1999 realiza mediciones de las concentraciones de 3-Nitrotirosina como mediador del estrés oxidativo mediado por peroxinitrito. Este autor encuentra que los niveles de la 3-Nitrotirosina se encuentran elevados en pacientes con ELA esporádica hasta 7 veces su nivel normal en comparación con sujetos control.(64)

Hay pocos estudios que realicen la determinación de nitratos y nitritos en pacientes con ELA esporádica. En el estudio de Taskiran(65) del 2,000 se encuentra una concentración elevada de nitratos y nitritos en LCR de pacientes con ELA esporádica en comparación con el grupo control, pero este autor solo encontró una diferencia significativa en los pacientes masculinos con ELA, y la diferencia fue mayor en la medición de suero que en la medición de LCR. En otro artículo Tohgi y Abe(66) en 1999 encontraron que los niveles de nitritos y nitratos en LCR de pacientes con ELA esporádica se encontraban elevados 73% mas que en los sujetos control. En nuestra serie, los pacientes con ELA esporádica tenían una elevación de nitratos 2.6 veces mayor que los sujetos control.

Esta bien establecido que los pacientes con ELA presentan alteraciones electrofisiológicas tales como: fibrilaciones, fasciculaciones, y reducción en numero y en amplitud de los potenciales de acción de unidad motora.(67,68) Pero no hay en la literatura una correlación entre los hallazgos electrofisiológicos y los niveles de nitratos, y la actividad de la SOD1. Nuestro estudio puede ser interesante debido a

que encontramos una buena correlación entre la disminución de la amplitud de las velocidades de conducción nerviosa motora y los niveles de nitratos, y la disminución de la actividad de la SOD1. Encontramos que a menor actividad de SOD1 y a mayor concentración de nitratos, las amplitudes de las velocidades de conducción nerviosa motora disminuyen. Esto hace pensar, que el estrés oxidativo mediado por ambas vías, se encuentra estrechamente relacionado con la progresión de la enfermedad.

## Conclusiones

De los diversos factores de riesgo relacionados con ELA esporádica, solo pudimos constatar 2 que son altamente significativos a saber: 1) la actividad física extrema y 2) el antecedente de ingesta de agua de pozo.

Confirmamos la hipótesis de que la actividad de la enzima antioxidante SOD1 se encuentra disminuida en el LCR de los pacientes con ELA esporádica, guardando una relación inversa con los niveles de nitratos, los cuales se encuentran elevados en los pacientes con ELA esporádica.

Finalmente encontramos una buena correlación entre las amplitudes de los potenciales de conducción motora para los nervios cubital y mediano, los niveles de la actividad de la SOD1 y los niveles de nitratos. Esto hace pensar que las amplitudes de miembros superiores son un buen indicador de un daño severo.

## Anexo 1

### Criterios de El Escorial para diagnóstico de Esclerosis Lateral Amiotrófica

#### A. La presencia de:

A:1 Evidencia de degeneración de neurona motora inferior por clínica, electrofisiología o examen neuropatológico

A:2 Evidencia de degeneración de neurona motora superior por clínica, electrofisiología o examen neuropatológico

A:3 Diseminación progresiva de los síntomas o signos dentro de una misma región o diseminación a regiones distintas determinado por historia clínica o exploración física

#### B. La Ausencia de:

B:1 Evidencia electrofisiológica y patológica de otro proceso patológico que pueda explicar los signos de degeneración de neurona motora superior y/o inferior, y

B:2 Evidencia neuroimagenológica de otro proceso patológico que pueda explicar los hallazgos encontrados en la exploración física, o los signos electrofisiológicos

# ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

## Anexo 2

### Clasificación de Esclerosis lateral amiotrófica por criterios de El Escorial

#### ELA definida por clínica

Se define por evidencia clínica en la presencia de datos de afección de Neurona motora superior e inferior en 3 regiones corporales diferentes.

#### ELA Probable por clínica

Se define por evidencia clínica en la presencia de datos de afección de Neurona motora superior e inferior en 2 regiones corporales diferentes, con datos de Neurona motora superior rostral a los signos de Neurona motora inferior.

#### ELA Probable por clínica y sustentada por laboratorio

Se define por evidencia clínica en la presencia de datos de afección de Neurona motora superior e inferior en 1 región corporal, o cuando se presentan solo datos de afección de Neurona motora superior en una región, y se encuentran datos de neurona motora inferior por criterios electromiográficos en al menos 2 miembros, aunado a estudios de laboratorio e imagen que descarten otra patología

#### ELA posible por clínica

Se define cuando se encuentran datos de Neurona motora superior e inferior en una región, o cuando hay presencia de afección de neurona motora superior en 2 regiones; o cuando los datos de afección de Neurona motora inferior son rostrales a los datos de Neurona motora superior, y el diagnóstico de ELA probable por clínica y sustentada por laboratorio no se puede establecer. Otros diagnósticos tienen que ser excluidos para sustentar el diagnóstico de ELA.

#### ELA sospechada por clínica

Es definida por la presencia de afección de Neurona motora inferior

### Anexo 3: Escala de graduación funcional en ELA

Criterio	Puntaje
<b>Lenguaje</b> 4 Normal 3 Alteraciones egóticas pero detectables 2 Ininteligible con repetición 1 Combinado con lenguaje no vocal 0 Pérdida de la función	
<b>Salivación</b> 4 Normal 3 Ligera pero definitivamente saliva excesiva en boca 2 Moderada salivación 1 Marcada salivación 0 Requiere aspiración continua por sonda	
<b>Deglución</b> 4 Normal 3 Problemas locales de deglución 2 Cambios de consistencia de la dieta 1 Requiere alimentación por sonda 0 Alimentación parenteral o enteral con sonda a permanencia	
<b>Escritura</b> 4 Normal 3 Lenta y torpe pero no requiere ayuda 2 No se emborrend todas las letras 1 Puede sostener la pluma pero no puede escribir 0 No sostiene la pluma	
<b>Comida y utensilios sin gastrostomía</b> 4 Normal 3 Lento y torpe pero no requiere ayuda 2 Puede cortar la comida con torpeza y lentitud, no requiere ayuda 1 La comida tiene que ser cortada por otra persona pero puede masticar 0 No puede comer ni masticar	
<b>Comida y utensilios con gastrostomía</b> 4 Normal 3 Torpe pero puede preparar su alimento 2 Requiere algo de ayuda para preparar el alimento 1 colabora muy poco para preparar los alimentos 0 No puede realizar ninguna actividad, tiene que ser alimentado	
<b>Vestido e higiene</b> 4 Normal 3 Independiente completamente pero con dificultad 2 Asistencia ocasional o sustituye métodos 1 Necesita ayuda para su cuidado diario 0 Completamente dependiente	
<b>Voltearse en cama y ajustar la ropa de cama</b> 4 Normal 3 Torpe y lento pero no requiere de ayuda 2 Puede voltearse solo y acomodar la ropa de cama con gran dificultad 1 Puede iniciar el movimiento pero tiene que ser ayudado a terminarlo 0 Completamente dependiente	
<b>Caminar</b> 4 Normal 3 Complicaciones locales para caminar 2 Camina con asistencia 1 No camina, solo tiene movimientos voluntarios 0 No presenta movimientos voluntarios	
<b>Subir escaleras</b> 4 Normal 3 Lento 2 Dificultad para subir escaleras y fregó 1 Requiere ayuda 0 No puede realizar la actividad	
<b>Respiración</b> 4 Normal 3 Dificultad para respirar a mínimos esfuerzos 2 Dificultad para respirar en reposo 1 Dificultad para respirar en reposo y necesidad ocasional de ventilador 0 Requiere ventilación mecánica permanente	
<b>Total</b>	

## Anexo 4

### Hoja de recolección de datos

Nombre: / \_\_\_\_\_ / Edad: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / Sexo: / \_\_\_ /  
No Reg: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / Fecha de datos y PL: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ /  
Originario: / \_\_\_\_\_ / Residente: / \_\_\_\_\_ /

Fecha inicio de los síntomas: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / Días de evolución. / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ /

Variedad de ELA / \_\_\_ / Escala funcional: / \_\_\_ /

1. ELA, 2. ELP, 3. AEP, 4. Bulb, 5. Monomiélica

Inicio de los síntomas: / \_\_\_ / 1. Bulbar, 2. Braquial, 3. Crural

Agua de pozo: / \_\_\_ / Organos fosforados: / \_\_\_ / Solvente: / \_\_\_ / Plásticos / \_\_\_ /

Trauma: / \_\_\_ / 1. mecánico, 2. eléctrico, 3. actividad física extrema

Medio: / \_\_\_ / 1. urbano, 2. rural OH / \_\_\_ / Tab: / \_\_\_ / Drog / \_\_\_ /

Familiar: / \_\_\_ / 1. Aiz, 2. Park, 3. Otros HAS: / \_\_\_ / DM / \_\_\_ / (1,2) Cancer: / \_\_\_ /

Tiroides / \_\_\_ / 1. Hiper, 2. Hipo Paratiroides. / \_\_\_ / 1. Hiper, 2. Hipo

Personales: / \_\_\_ / 1. HAS, 2. DM1, 3. DM2, 4. cancer, 5. Hipert3, 6. HipoT3, 7

HiperPTH, 8. HipoPTH, 8. autoinmune, 9. alérgicos, 10. Qx, 11. trans

Sangre: / \_\_\_ / HIV: / \_\_\_ / TRH: / \_\_\_ / \_\_\_ / T3: / \_\_\_ / T4: / \_\_\_ /

LCR1: Cel: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / Linf: / \_\_\_ / \_\_\_ / Prot: / \_\_\_ / \_\_\_ / Glu: / \_\_\_ / \_\_\_ / Tf: TF:

LCR2: Cel: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / Linf: / \_\_\_ / \_\_\_ / Prot: / \_\_\_ / \_\_\_ / Glu: / \_\_\_ / \_\_\_ / Tf: TF:

Actividad de SOD1: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / Nitratos: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ /

IRM: / \_\_\_ / 1. Normal, 2 Hiper T2, 3 Hipo T2, 4. Corticoespinal

EMG: / \_\_\_ / 1. Normal, 2. Fibrilación, 3. Fasciculación

PAMC: / \_\_\_ / 1 < No, 2 > amplitud, 3. > duración

VCNM: / \_\_\_ / 1 Normal, 2. AMP, 3. Lat, 4. VC, 5. F

Anexo 5: Carta de consentimiento informado por escrito

México DF a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 199 \_\_\_\_.

Por medio de la presente, hago constar que yo

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
com  
o familiar responsable del  
paciente \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ doy  
mi consentimiento para que mi paciente sea ingresado al protocolo  
de investigación: Factores de riesgo y biomarcadores de estrés  
oxidativo en Esclerosis Lateral Amiotrófica. Así mismo, autorizo al  
personal médico del Instituto nacional de Neurología y  
Neurocirugía Manuel Velasco Suárez a que le practiquen a mi  
paciente el estudio de Punción lumbar para análisis de actividad de  
Superóxido dismutasa 1 y nitratos en Líquido Cefalorraquídeo.

Estoy enterado de los posibles beneficios, así como de los  
posibles riesgos y complicaciones que pudieran suceder a mi  
paciente al ingresar al estudio.

\_\_\_\_\_  
Firma de Familiar Responsable

\_\_\_\_\_  
Testigo

## Bibliografia

- 1 Christensen PD, Hoyer-Pedersen E, Jensen NB: Survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis in two Danish counties. *Neurology* 40:600-604, 1990
- 2 Forsgren L, Almay BG, Holmgren G, et al. Epidemiology of motor neuron disease in northern Sweden. *Acta Neurol Scand* 68:20-29, 1983
- 3 Gunnarsson L-G, Palm R: Motor neuron disease and heavy manual labor. An epidemiological survey of Varmland County, Sweden. *Neuroepidemiology* 3:195-206, 1984
- 4 Mitchell JD, Gibson HN, Gatrell A: Amyotrophic lateral sclerosis in Lancashire and South Cumbria, England, 1976-1986. A geographical study. *Arch Neurol* 47:875-880, 1990
- 5 Murros K, Fogelholm R: Amyotrophic lateral sclerosis in Middle-Finland: An epidemiological study. *Acta Neurol Scand* 67:41-47, 1983
- 6 Holloway SM, Emery AEH: The epidemiology of motor neuron disease in Scotland. *Muscle Nerve* 5:131-133, 1982
- 7 Holloway SM, Mitchell JD: Motor neuron disease in the Lothian Region of Scotland, 1961-1981. *J Epidemiol Community Health* 40:344-350, 1986
- 8 Jokelainen M: The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Finland. A study based on the death certificates of 421 patients. *J Neurol Sci* 29:55-63, 1976
- 9 Chancellor AM, Slattery JM, Fraser H, et al: Risk factors for motor neuron disease: A case-control study based on patients from the Scottish Motor Neuron Disease Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:1200-1206, 1993
- 10 Felmus MT, Patten BM, Swanke L: Antecedent events in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 26:167-172, 1976
- 11 Deapen DM, Henderson BE: A case-control study of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol* 123:790-799, 1986
- 12 Gallagher JP, Sanders M: Trauma and amyotrophic lateral sclerosis: A report of 78 patients. *Acta Neurol Scand* 75:145-150, 1987
- 13 Campbell AMG, Williams ER, Barltrop D: Motor neurone disease and exposure to lead. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 33:877-885, 1970
- 14 Deapen DM, Henderson BE: A case-control study of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol* 123:790-799, 1986
- 15 Brooks BR: Clinical epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Clin* 1996;14:399-420.
- 16 Jerusalem F, Pohl Ch, Karitzky J, Ries F: ALS. *Neurology* 1996;47(suppl 4):S218-S220
- 17 Rowland L, Sherman W, Latov N, et al: Amyotrophic lateral sclerosis and lymphoma: Bone marrow examination and other diagnostic tests. *Neurology* 42:1101-1102, 1992
- 18 Conradi S, Ronnevi L, Norris F: Motor neuron disease and toxic metals. In Rowland L (ed) *Advances in Neurology: Human Motor Neuron Disease*, Vol 36. New York, Raven Press, 1982, pp 201-231
- 19 Haverkamp LJ, Appel V, Appel SH: Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. *Brain* 1995;118:707-719

20. Robitaille R, Adler EM, Charlton MP. Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 1990;5:773-779.
21. Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V, et al. P-type voltage dependent calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3330-3333.
22. Engelhardt JJ, Sikios L, Komuves L, et al. Antibodies to calcium channels from ALS patients passively transferred into mice selectively increase intracellular calcium and induce ultrastructural changes in motoneurons. *Synapse* 1995;20:185-199.
23. Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease. elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 1995;4:209-216.
24. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurolo* 1990;28:18-25.
25. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin J, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurolo* 1995;38:73-84.
26. Tandan R, Bradley WG. Amyotrophic lateral sclerosis. Part I. Clinical features, pathology, and ethical issues in management. *Ann Neurolo* 1985;18:271-280.
27. Siddique T. Molecular genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. In: Rowland LP, ed. *Advances in Neurology*, vol 56. Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases. New York: Raven Press 1991:227-231.
28. Siddique T, Figlewicz DA, Pericak-Vance MA, et al. Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N Engl J Med* 1991;324:1381-1384.
29. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994;264:1772-1775.
30. Dal Canto MC, Gurney ME. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu, Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* 1995;676:25-40.
31. Dal Canto MC, Gurney ME. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 1994;145:1271-1279.
32. Bredesen D, Ellerby L, Hart P, et al. Do post translational modifications of CuZnSOD lead to sporadic amyotrophic lateral sclerosis? *Ann Neurolo* 1997;42:135.
33. Beal M. Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases (review). *Ann Neurolo* 1995;38:357.
34. World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases. El Escorial World Federation of Neurology Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurolo Sci* 1994;124(Suppl):96-107.
35. Brooks BR. The Norris ALS score: insight into the natural history of amyotrophic lateral sclerosis provided by Forbes' Norms. In: Rose FC (ed). *ALS - From Charcot to the present and into the future - The Forbes H. Norris (1928 - 1993) Memorial Volume*. London: Smith - Gordon, 1994:21-29. [Advances in ALS/MND, Vol 3].

- 36 Schwartz PJ, Andrew R, Scott R, Coyle JT. Effects of over – and under – expression of Cu,Zn – superoxide dismutase on the toxicity of glutamate analogs in transgenic mouse striatum *Brain Research* 1998;789 32-39
- 37 Zecca L, Rosati M, Renella R, Galimberti M, Ambrosini A, Fariello RG Nitrite and nitrate levels in cerebrospinal fluid of normal subjects. *J Neural Transm* 1998;105:627-633
- 38 Chancellor AM, Hendry A, Caird FI. Motor neuron disease A disease of old age *Scot Med J* 1993;38 178-182
- 39 Chancellor AM, Warlow CP. Adult onset motor neuron disease: Worldwide mortality, incidence, and distribution since 1950. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:1106-1115.
- 40 Durlleman S, Alperovitch A Increasing trend of ALS in France and elsewhere Are the changes real? *Neurology* 1989;39 768-773.
- 41 Cendrowski W, Wender W, Owsianowski M Analyse épidémiologique de la sclérose latérale amyotrophique sur le territoire de la Grand Pologne. *Acta Neurol Scand* 1970;46:609-617
- 42 Friedman AP, Freedman D. Amyotrophic lateral sclerosis *J Nerv Ment Dis* 1950,11 1-18
- 43 Norris F, Shepard R, Denys E, et al: Onset, natural history and outcome in idiopathic adult motor neuron disease. *J Neurol Sci* 118(1):48, 1993
44. Radhakshnana K, Ashok PP, Sridharan R, et al. Descriptive epidemiology of motor neuron disease in Benghazi, Libya. *Neuroepidemiology* 1986;5:47-54
- 45 Granieri E, Carreras M, Tola R, et al: Motor neuron disease in the province of Ferrara, Italy in 1964-1982 *Neurology* 38:1604-1608, 1988
- 46 Kurtzke JF, Kurtland LT The epidemiology of neurologic disease *in* Baker AB (ed). *Clinical Neurology IV* Philadelphia, Harper & Row, 1983, 1-143
47. Plato CC, Garruto RM, Fox KM, et al Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam: A 25-year prospective case-control study. *Am J Epidemiol* 124:643-656, 1986
- 48 Savettien G, Salemi G, Arcara A, et al: A case-control study of amyotrophic lateral sclerosis *Neuroepidemiology* 10 242-245, 1991
- 49 Potemkowski A, Hoczarenko K, Fabian A Clinical course and epidemiological analysis of amyotrophic lateral sclerosis in Szczecin in 1986-1995 *Neurol Neurochir Pol* 1999,33(1) 71-78.
- 50 Chancellor AM, Fraser H, Swingler RJ, et al. Clinical heterogeneity of familial motor neuron disease: Report of 11 pedigrees from a population-based study in Scotland. The Scottish Motor Neuron Disease Research Group *J Neurol Sci* 1994;124(suppl):75-76
- 51 Deng H-X, Hentati A, Tainer JA, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase *Science* 1993,261 1047-1051
- 52 Emery AEH, Hollaway S Familial motor neuron disease *In* Rowland, LP (ed) *Human Motor Neuron Diseases* Raven Press, New York, 1982,pp 139-147
- 53 Kurtland LT, Mulder DW Epidemiological investigations of amyotrophic lateral sclerosis Familial aggregations indicative of dominant inheritance Part II *Neurology* 1955,5:249-268
- 54 Mulder DW, Kurtland LT, Offord KP, et al Familial adult motor neuron disease Amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1986,36:511-517

- 55 Rosen DR, Siddique T, Petterson D, et al Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis *Nature* 1993;362:59-62
- 56 Strong MJ, Hudson AJ, Altvord WG Familial amyotrophic lateral sclerosis, 1850-1989 A statistical analysis of the world literature. *Can J Neurol Sci* 1991;18:45-58
- 57 Snaedal J, Kristinsson S, Gunnarsdóttir, Á, Ólafsdóttir, M, Baldvinsson & T Jóhannesson Copper, ceruloplasmin and superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease *Dement Geriatr. Cogn Disord.* 1998, 9, 239-242
- 58 Tórsdóttir, G. J. Kristinsson, S. Sveinbjörnsdóttir, J Snaedal & T. Jóhannesson: Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease *Pharmacology & Toxicology* 1999, 85, 239-243
59. Torsdottir G, Kristinsson J, Gudmundsson G, Snaedal J, Johannesson T. Copper, Ceruloplasmin and Superoxide Dismutase (SOD) in Amyotrophic Lateral Sclerosis *Pharmacology & Toxicology* 2000;87(3):126-130.
60. Nishiyama K, Murayama S, Kwak S, Kanazawa I. Expression of the Copper-Zinc Superoxide Dismutase Gene in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology* 1997;41(4):551-556.
61. Shaw CE, Enayat ZE, Chioza BA, Al-Chalabi A, Radunovic A, Powell JF, Leigh PN Mutations in All Five Exons of SOD-1 May Cause ALS *Annals of Neurology* 1998;43(3):390-394
- 62 Jackson M, Al-Chalabi A, Enayat Z, Chioza B, Leigh PN, Morrison KE, Copper/Zinc Superoxide Dismutase 1 and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis: Analysis of 155 Cases and Identification of a Novel Insertion Mutation. *Annals of Neurology* 1997;42(5):803-807.
63. Beal M, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown RH. Increased 3-Nitrotyrosine in Both Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology* 1997;42(4):644-654
- 64 Tohgi H. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis *Ann Neurol* 1999;46(1) 129-131
65. Taskiran D, Sagduyu A, Yuceyar N, Kutay FZ, Pogun S. Increased cerebrospinal fluid and serum nitrite and nitrate levels in amyotrophic lateral sclerosis *Int J Neurosci* 2000;101(1-4) 65-72
- 66 Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C. Increase in oxidized NO products and reduction in oxidized glutathione in cerebrospinal fluid from patients with sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 1999;260(3) 204-206.
- 67 Behnia M, Kelly JJ Role of electromyography in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1991;14:1236-1241
- 68 Lambert EH Electromyography in amyotrophic lateral sclerosis In Norns, FH Jr and Kurland, LT (eds): *Motor Neuron Disease* Grune and Stratton, New York, 1969, pp 135-153
- 69 Gutmann L, Mitsumoto H *Advances in ALS Neurology* 1996;47(Suppl 2) S17-S18
- 70 Otero-Siliceo E, Amada-Mendiola N, Corona-Vazquez T Frequency of motor neuron diseases in a Mexico City referral center *Revista de investigación clínica* 1997;49(6) 445-448
- 71 Flohé L, Otting F. Superoxide dismutase assays, *Methods Enzymol* 1984;105 93-104
72. Rothstein JD Excitotoxicity hypothesis *Neurology* 1996;47(Suppl 2):S19-S26

73. Siddique T, Nijhawan D, Hentati A. Molecular genetic basis of familial ALS. *Neurology* 1996;47(Suppl 2):S27-S35
74. Bredensen DE, Wiedau-Pazos M, Goto JJ, et al. Cell death mechanisms in ALS. *Neurology* 1996;47(Suppl 2):S36-S39
75. Beckman JS, Crow JP, Ye YZ. Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 1994;103:371-380
76. Nishida CR, Gralla EB, Valentine JS. Characterization of three yeast Koper-zinc superoxide dismutase mutants analogous to those coded for in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9906-9910
77. Mitsumoto H, Chad DA, Piroo EP. Excitotoxicity and oxidative damage in amyotrophic lateral sclerosis. In: *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Ed, Davis FA. *Contemporary Neurology Series* Davis Co Philadelphia 1998:197-225.