



## ORIGINAL

# Incremento de las citoquinas proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y proteína inflamatoria macrofágica-1 $\beta$ (MIP-1 $\beta$ ) en líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica



H.R. Martínez<sup>a,b,c,\*</sup>, C.E. Escamilla-Ocañas<sup>a,b</sup>, C.R. Camara-Lemarroy<sup>c</sup>,  
M.T. González-Garza<sup>b</sup>, J. Moreno-Cuevas<sup>b</sup> y M.A. García Sarreón<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Neurología y Neurocirugía, Centro Médico Zambrano Hellion, Tecnológico de Monterrey, San Pedro Garza García, Nuevo León, México

<sup>b</sup> Terapia Celular, Centro de Innovación y Transferencia en Salud (CITES), Escuela Nacional de Medicina, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, Nuevo León, México

<sup>c</sup> Servicio de Neurología, Hospital Universitario Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, Nuevo León, México

Recibido el 5 de enero de 2017; aceptado el 6 de julio de 2017

Accesible en línea el 11 de octubre de 2017

### PALABRAS CLAVE

Esclerosis lateral amiotrófica (ELA);  
Citoquinas;  
MIP-1 $\beta$ ;  
MCP-1;  
Neuroinflamación;  
Biomarcador

### Resumen

**Introducción:** En la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se ha descrito recientemente la presencia de neuroinflamación. Sin embargo, no se ha definido el rol de citoquinas proinflamatorias como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y la proteína inflamatoria macrofágica-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) en ELA. En este estudio evaluamos niveles de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  en líquido cefalorraquídeo (LCR), analizando su participación en la duración y gravedad de la ELA.

**Métodos:** En 77 pacientes con ELA definida y 13 sujetos controles, se comparó el nivel de citoquinas MCP-1 y MIP-1 $\beta$  en LCR. Se analizaron estos niveles con relación a la duración de la ELA (< 12 meses vs. > 12 meses) y a la gravedad de esta determinada mediante el puntaje obtenido al ingreso en la escala funcional estratificada de la ELA (< 30 puntos vs. > 30 puntos).

**Resultados:** En los 77 pacientes con ELA, se encontraron aumentados los niveles de MIP-1 $\beta$  (4,69 pg/ml vs. 10,68 pg/ml,  $p < 0,0001$ ) y MCP-1 (160,95 pg/ml vs. 234,89 pg/ml,  $p = 0,011$ ) en comparación con sujetos controles. No se observó diferencia de los niveles de estas citoquinas con la duración o la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, observamos una correlación positiva significativa entre MIP-1 $\beta$  y MCP-1 en pacientes con ELA.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [dr.hectormartinez@medicos.tecsalud.mx](mailto:dr.hectormartinez@medicos.tecsalud.mx) (H.R. Martínez).

**KEYWORDS**

Amyotrophic lateral sclerosis (ELA);  
Cytokines;  
MIP-1 $\beta$ ;  
MCP-1;  
Neuroinflammation;  
Biomarkers

**Conclusiones:** El aumento de MIP-1 $\beta$  y MCP-1 sugiere que estas citoquinas parecen tener un efecto sinérgico en la patogénesis de la ELA. Sin embargo, en nuestra cohorte no se asociaron con la duración o la gravedad de la ELA.

© 2017 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Increased cerebrospinal fluid levels of cytokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ (MIP-1 $\beta$ ) in patients with amyotrophic lateral sclerosis

**Abstract**

**Introduction:** Neuroinflammation has recently been described in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). However, the precise role of such proinflammatory cytokines as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) in ALS has not yet been determined. In this study, we determined cerebrospinal fluid (CSF) MCP-1 and MIP-1 $\beta$  levels and assessed their association with the duration and severity of ALS.

**Methods:** Concentrations of MCP-1 and MIP-1 $\beta$  were determined in the CSF of 77 patients diagnosed with ALS and 13 controls. Cytokine levels were analysed in relation to ALS duration (< 12 months vs. > 12 months) and severity (< 30 points vs. > 30 points on the ALS Functional Rating Scale administered at hospital admission).

**Results:** Higher CSF MIP-1 $\beta$  (10.68 pg/mL vs. 4.69 pg/mL,  $P < .0001$ ) and MCP-1 (234.89 pg/mL vs. 160.95 pg/mL,  $P = .011$ ) levels were found in the 77 patients with ALS compared to controls. There were no differences in levels of either cytokine in relation to disease duration or severity. However, we did observe a significant positive correlation between MIP-1 $\beta$  and MCP-1 in patients with ALS.

**Conclusions:** The increase in MIP-1 $\beta$  and MCP-1 levels suggests that these cytokines may have a synergistic effect on ALS pathogenesis. However, in our cohort, no association was found with either the duration or the clinical severity of the disease.

© 2017 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introducción**

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa y fatal a corto plazo, caracterizada por un rápido deterioro debido a la muerte selectiva de las neuronas motoras en la corteza cerebral, el tronco encefálico y la médula espinal<sup>1-3</sup>. La ELA ha sido tradicionalmente definida como un proceso neurodegenerativo; sin embargo, su etiología y mecanismos patogénicos no han sido bien definidos<sup>3,4</sup>.

De acuerdo con estudios recientes, la neuroinflamación es un hallazgo patológico prominente en los sitios de lesión de la neurona motora. Se caracteriza por activación de la microglía, astrogliosis e infiltración de monocitos y células-T<sup>5</sup>. Adicionalmente, se ha descrito que un proceso inflamatorio contribuye a la patogénesis de la ELA, el cual es mediado por el sistema inmune dentro del sistema nervioso central (SNC), incluidas las citoquinas proinflamatorias, que desempeñan un papel crítico en la activación microglial<sup>5-9</sup>. Además, se considera que las citoquinas participan en el proceso de migración de monocitos periféricos/macrófagos y otros leucocitos al SNC de pacientes con ELA<sup>5,10-13</sup>.

La proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y la proteína inflamatoria macrófaga 1- $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) pertenecen a la subfamilia CC de las quimiocinas y actualmente se conoce su participación en otras enfermedades

neurodegenerativas<sup>14-16</sup>. Se ha descrito el aumento de la expresión de MCP-1 en modelos murinos de ELA y en médula espinal de sujetos con ELA<sup>12,16</sup>. Sin embargo, según nuestro conocimiento, no existe reporte previo alguno que describa la expresión de MIP-1 $\beta$  en sujetos con esta entidad clínica. Además, en la actualidad no se ha definido si los cambios en estas citoquinas tienen un efecto protector o perjudicial en la ELA<sup>5</sup>.

En el presente estudio, comparamos los niveles de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con ELA y sujetos controles y se determinó su relación con la gravedad clínica y la duración de la enfermedad.

**Sujetos y métodos****Sujetos**

Se incluyeron 77 pacientes con ELA (edad media: 50,18  $\pm$  10,85 años) y 13 controles (edad media: 39,15  $\pm$  11,32 años) atendidos en el Servicio de Neurología del Hospital Zambrano-Hellion del Tecnológico de Monterrey y en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Los sujetos del grupo de control se incluyeron

después de la realización de estudios para la evaluación de pacientes con cefalea que acudieron a urgencias de ambas instituciones. Este grupo de pacientes contaban con LCR y resonancia magnética de cerebro (RMN) sin alteraciones y se confirmó su diagnóstico definitivo de cefalea tensional.

Un neurólogo certificado evaluó a los pacientes con ELA y el diagnóstico se estableció de acuerdo con los criterios clínicos y neurofisiológicos de El Escorial<sup>17</sup>. En el momento de la inclusión se obtuvieron los siguientes datos clínicos adicionales: el intervalo de inicio clínico al diagnóstico (ICD), el intervalo de diagnóstico a inclusión en el estudio (IDI) y la escala funcional para ELA (ALSFRS-R, por sus siglas en inglés)<sup>18</sup>. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina del Tecnológico de Monterrey y por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la UANL.

### Preparación de líquido cefalorraquídeo y análisis de quimiocinas

Se obtuvieron muestras de LCR de pacientes con ELA y controles al firmar la carta de consentimiento informado por escrito. Las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que se analizaron. Los niveles de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  se cuantificaron usando un kit comercialmente disponible (Bio-PlexPro™, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, 50  $\mu\text{l}$  de muestra se incuban con 50  $\mu\text{l}$  de microesferas magnéticas cubiertas con anticuerpos que reaccionan específicamente con cada citoquina. La discriminación de cada citoquina en una suspensión determinada se realizó por medio del análisis espectral por fluorescencia con un citómetro de flujo con láser. Después de una serie de lavados, se añadió un anticuerpo de detección para crear un complejo «sándwich» a cada muestra y posteriormente se agregó conjugado de estreptavidina-ficoeritrina. Finalmente, se agregó una solución *buffer* a cada pozo de la placa para detener la reacción; los datos se adquirieron y analizaron en un sistema de lectura Bio-Plex 200. El límite de detección para cada citoquina fue de 1 pg/ml.

### Análisis estadístico

Las variables se describieron en términos de media  $\pm$  desviación estándar y medianas (rango intercuartil) para datos de distribuciones normales y no normales, respectivamente. Se realizó una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para comparar los niveles de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  en LCR de pacientes con ELA y sujetos controles. Los pacientes fueron divididos en dos subgrupos según el IDI: pacientes con menos de 12 meses de evolución (ELA < 12 meses) y aquellos con IDI de más de 12 meses evolución (ELA > 12 meses). Se realizó una comparación adicional entre los niveles de quimiocinas y la condición clínica de los pacientes: puntaje < 30 puntos en la escala funcional de ELA (ALSFRS-R) contra aquellos pacientes con puntaje  $\geq$  30 puntos. Los efectos de la duración y la gravedad de la enfermedad en relación con los niveles de MIP-1 $\beta$  y MCP-1 se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las correlaciones bivariadas simples se

**Tabla 1** Niveles de citoquinas del LCR en la ELA que muestran los subgrupos de ELA por duración de la enfermedad y gravedad clínica

Citoquina	Control (mediana)	ELA (mediana)	Valor de p
MIP-1 $\beta$ (pg/ml)	4,69 (4,26)	10,68 (7,03)	<b>p &lt; 0,0001</b>
MCP-1 (pg/ml)	160,95 (147,35)	234,89 (151,12)	<b>p = 0,011</b>
	<i>&lt; 12 meses</i>	<i>&gt; 12 meses</i>	<i>Valor de p</i>
MIP-1 $\beta$ (pg/ml)	10,16 (8,48)	11,72 (6,44)	NS
MCP-1 (pg/ml)	232,7 (127,95)	236,2 (158,53)	NS
	<i>&lt; 30 puntos</i>	<i>&gt; 30 puntos</i>	<i>Valor de p</i>
MIP-1 $\beta$ (pg/ml)	10,3 (7,16)	10,75 (7,08)	NS
MCP-1 (pg/ml)	230,7 (108,13)	241,4 (192,59)	NS

Los valores expresados entre paréntesis indican rango intercuartil. En negrita, los valores estadísticamente significativos.

evaluaron con la prueba de Spearman. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS 20.0.

## Resultados

### Muestra

De los 77 pacientes incluidos, 48 (62,3%) eran varones. Veinte pacientes presentaron ELA de inicio bulbar, 53 tuvieron inicio espinal y 4 tuvieron un inicio bulbospinal. La mediana del IDI fue de 11 meses (rango intercuartil de 6 a 19) y la mediana del ICD fue de 10 meses (rango intercuartil de 7 a 18 meses).

### Concentración de quimiocinas en líquido cefalorraquídeo

La mediana de MCP-1 en LCR fue de 234,89 (151,12) pg/ml en los pacientes con ELA y de 160,95 (147,35) pg/ml en los controles (p=0,011). La mediana de MIP-1 $\beta$  fue de 10,68 (7,03) pg/ml en los pacientes con ELA y de 4,69 (4,26) pg/ml en los controles (p < 0,0001) (tabla 1). No se encontraron diferencias en cuanto al sexo en las concentraciones de MCP-1 o MIP-1 $\beta$ .

Los pacientes con ELA > 12 meses de evolución tuvieron una mediana de MIP-1 $\beta$  de 11,72 (6,44) pg/ml y aquellos con ELA < 12 meses, una mediana de MIP-1 $\beta$  de 10,16 (8,48) pg/ml (p=0,4). Los pacientes con ELA > 12 meses tuvieron una mediana de MCP-1 de 236,2 (158,53) pg/ml y aquellos con ELA < 12 meses, una mediana de 232,7 (127,95) pg/ml (p=0,7).

Los pacientes con mejor condición clínica (puntuación > 30 puntos en la escala funcional ALSFRS-R) tuvieron una mediana de MIP-1 $\beta$  de 10,75 (7,08) pg/ml y de MCP-1 de

241,4 (192,59) pg/ml ( $p=0,4$ ). Aquellos con mayor deterioro clínico (puntuación  $<30$  en la escala funcional) tuvieron una mediana de MIP-1 $\beta$  de 10,3 (7,16) pg/ml y de MCP-1 de 230,7 (108,13) pg/ml. Los casos con mejor condición clínica tuvieron un incremento en MCP-1 y en MIP-1 $\beta$ ; pero sin mostrar significación estadística ( $p=0,5$ ).

## Correlaciones

Se encontró una correlación positiva y significativa entre los niveles de MIP-1 $\beta$  y MCP-1 en toda la muestra ( $r=0,365$ ,  $p=0,001$ ), así como en el grupo de pacientes con ELA ( $r=0,309$ ,  $p=0,006$ ). Ninguna citoquina se correlacionó con la edad o la puntuación de la escala funcional (datos no presentados).

## Discusión

La ELA ha sido tradicionalmente considerada un trastorno neurodegenerativo<sup>1,3</sup>. Sin embargo, los cambios neuroinflamatorios con activación de células microgliales se han descrito en la corteza motora y la médula espinal de sujetos con esta enfermedad<sup>19</sup>. El proceso subyacente de activación celular y las moléculas de señalización que median las interacciones celulares en la ELA, en la actualidad, no están bien definidos<sup>7</sup>. Las citoquinas de la clase CC (MCP-1 y MIP-1 $\beta$ ) se han descrito como mediadoras de inflamación crónica en otras enfermedades neurodegenerativas<sup>15,20,21</sup>. De manera similar, estudios recientes describen la infiltración de monocitos periféricos/macrófagos en el SNC de pacientes con ELA<sup>10,11</sup>. Estos monocitos invasores exhiben una expresión prominente de MCP-1 y otras citoquinas relacionadas con la quimiotaxis<sup>12</sup>. La elevación de MCP-1 durante el curso de la patogénesis de ELA se ha descrito previamente<sup>16,22,23</sup>; sin embargo, los mecanismos que desencadenan este incremento se desconocen en la actualidad<sup>16</sup>.

En el presente estudio, hemos identificado un aumento significativo de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  en pacientes con ELA definida. Estas citoquinas también se correlacionaron significativamente. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que sugiere que MIP-1 $\beta$  podría, también, estar participando en la patogénesis ELA.

Se cree que la microglía que reside en el SNC es la principal moduladora de la respuesta inmunológica alterada en la ELA, y la participación de monocitos periféricos es controversial<sup>24</sup>. Nuestro hallazgo de mayores niveles de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  en el LCR sugiere que las células dendríticas y los macrófagos periféricos pudieran participar en la fisiopatología de la ELA<sup>16</sup>. La falta de información acerca de una correlación con niveles séricos de estas citoquinas no nos permite determinar si su origen es central o periférico (por alteración de la barrera hematoencefálica). Ambas células inmunes pueden modificar la función de las células-T y controlar la inmunidad innata y adaptativa. Sin embargo, no se sabe si participan como efectores del daño o se encuentran en un papel protector.

En nuestra cohorte, los casos de ELA con mayor duración de la enfermedad tuvieron un ligero aumento en MIP-1 $\beta$  y una disminución en MCP-1, pero estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Nuestros

resultados no asocian los niveles de estas citoquinas con la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, en la ELA, no está claro el momento en que inicia la expresión de citoquinas y si estas respuestas tienen efecto protector o perjudicial<sup>16</sup>.

La ELA es una entidad clínica bastante heterogénea<sup>4</sup>. La amplia variación en la expresión clínica, duración y severidad de la enfermedad determinada por la escala funcional de ELA (ALSFRS-R) pueden explicar que las diferencias observadas en MCP-1 y MIP-1 $\beta$  fueran no significativas en nuestra cohorte. La correlación de estas citoquinas con la supervivencia y la progresión clínica serían de mayor utilidad para definir la participación del proceso inflamatorio mediado por citoquinas en la ELA. La comprensión del ambiente de las citoquinas en el curso de la ELA y su participación en la progresión clínica son un aspecto crucial para el desarrollo de biomarcadores y de estrategias terapéuticas eficaces. Limitantes en nuestro estudio que deberán analizarse en futuros estudios incluyen: el tamaño de la muestra, la heterogeneidad de la cohorte, el número de sujetos controles y la evaluación de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  en sangre y LCR. La progresión mediante escalas más objetivas además de la sobrevivencia son factores a considerar. Sin embargo, nuestros resultados sugieren, por primera vez, que las concentraciones de MIP-1 $\beta$  pueden estar elevadas en pacientes con ELA y participar en su patogénesis.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

## Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Sergio Lozano-Rodríguez, por su ayuda en la revisión del manuscrito.

## Bibliografía

1. Mills KR. The natural history of central motor abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2003;136:2558–66.
2. Toft MH, Gredal O, Pakkenberg B. The size distribution of neurons in the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *J Anat*. 2005;207:399–407.
3. Ringel SP, Murphy JR, Alderson MK, Bryan W, England JD, Miller RG, et al. The natural history of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 1993;43:1316–22.
4. Ravits J, Appel S, Baloh RH, Barohn R, Brooks BR, Elman L, et al. Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: What phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2013;14(Suppl. 1):5–18.
5. Zhao W, Beers DR, Appel SH. Immune-mediated mechanisms in the pathoprogession of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8:888–99.
6. Beers DR, Zhao W, Liao B, Kano O, Wang J, Huang A, et al. Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ELA. *Brain Behav Immun*. 2011;25:1025–135.

7. Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol.* 2011;10:253–63.
8. McCombe PA, Henderson RD. The role of immune and inflammatory mechanisms in ELA. *Curr Mol Med.* 2011;11:246–54.
9. Liu J, Gao L, Zang D. Elevated levels of IFN- $\gamma$  in CSF and serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 2015;10:e0136837.
10. 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;125:111–20.
11. Rezaei-Zadeh K, Gate D, Town T. CNS infiltration of peripheral immune cells: D-day for neurodegenerative disease? *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009;4:462–75.
12. Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos, 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.
13. Wilms H, Sievers J, Dengler R, Bufler J, Deuschl G, Lucius R. Intrathecal synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in amyotrophic lateral sclerosis: Further evidence for microglial activation in neurodegeneration. *J Neuroimmunol.* 2003;144:139–42.
14. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1882–6.
15. Boven LA, Montagne L, Nottet HS, de Groot CJ. Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha), MIP1beta, and RANTES mRNA semi quantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clin Exp Immunol.* 2000;122:257–63.
16. Henkel JS, Beers DR, Sikl3s L, Appel SH. The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attacks are increased in the mSOD1 mouse model of ELA. *Mol Cell Neurosci.* 2006;31:427–37.
17. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000;1:293–9.
18. Kaufmann P, Ley G, Thompson JL, Delbene ML, Battista V, Gordon PH, et al. The ALSFRS-R predicts survival time in an ELA clinic population. *Neurology.* 2005;64:38–43.
19. Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol.* 1992;140:691–707.
20. Proudfoot AE. Chemokine receptors: Multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:106–15.
21. Tejera-Alhambra M, Casrouge A, de Andr3s C, Seyffferth A, Ramos-Medina R, Alonso B. Plasma biomarkers discriminate clinical forms of multiple sclerosis. *PLoS One.* 2015;10:e0128e952.
22. Kuhle J, Linderberg RL, Regeniter A, Mehling M, Steck AJ, Kappos L, et al. Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 2009;16:771–4.
23. Tanaka M, Kikuchi H, Ishizu T, Minohara M, Osoegawa M, Motomura K, et al. Intrathecal upregulation of granulocyte colony stimulating factor and its neuroprotective actions on motor neuron in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65:816–25.
24. Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and toxic neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2015;12:364–75.