



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Estudio de la osteopontina en la esclerosis múltiple y su relación con la progresión de la enfermedad.

Tutor de tesi: Vicent Fonollosa Pla

Director de tesi: Xavier Montalban Gairin

Imma Pericot Nierga

Tesi doctoral

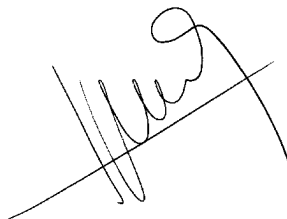
Barcelona, 2004

Xavier Montalban Gairin, adjunt del Servei de Neurologia i Cap de la Unitat de Neuroimmunologia Clínica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron,

FA CONSTAR,

Que la Tesi Doctoral titulada *Estudio de la osteopontina en la esclerosis múltiple y su relación con la progresión de la enfermedad*, presentada per na Imma Pericot Nierga, per a optar al grau de Doctor, s'ha realitzat sota la seva direcció.

Barcelona, març de 2004



Dr. Xavier Montalban Gairin

A en Xevi,

Agraiments

AGRAÏMENTS

Al meu director de tesi, en Xavier Montalban, que em va introduir en el fascinant mon de l'esclerosi múltiple. Pel seu gran rigor científic, entusiasme i aspecte humà. Per deixar-me formar part de la gran família de la unitat de neuroimmunologia clínica, que m'han fet sentir com a casa. Gràcies per les estones compartides.

A en Manolo Comabella, per la seva ajuda inestimable durant la realització de la tesi, així com d'en Robert Goertsches. Tampoc no puc oblidar la resta de gent del laboratori com la Carmen Espejo, la Mireia Castillo i la Cristina López. Moltes gràcies a tots ells.

Un agraïment molt especial a la Mar Tintoré, per ajudar-me a fer els primers passos en el complicat mon de la neurologia, pels seus bons consells i per demostrar-me que sempre podré comptar amb ella. Gràcies per ajudar-me en *l'incident* de l'Índia.

Als clínics de la unitat, uns de més *vells* i d'altres de més joves. En Jordi Río, en Carlos Nos, la Ingrid Galan, la Neus Téllez, així com l'Alex Rovira, per tot el que m'han ensenyat i les rialles compartides.

I especialment al meu gran amic Jaume Sastre. Un personatge únic amb el que vaig tenir la sort de compartir *sa* residència i *es* meu primer any a la unitat. Per les llargues xerrades amb les *birres* i les tapes a la plaça del Sol. Una *besada* Sastre.

Pel gran recolzament que vaig tenir de la resta de personal de la unitat. Les infermeres: la Mariajo i la Rosalia; les psicòlogues, la Joana i la Chusi; sense oblidar la Núria, la Dúnia, en Josep i la Eli. Sempre disposats a donar un cop de mà.

A en Secundí López-Pousa i la resta de la gent de la UvaMiD, que són els meus companys actuals: en Toni, la Sílvia, en Josep, la Manoli, la Marta, la M^a del Mar, la Vero i l'Anna. Per rebre'm amb els braços oberts i donar-me la oportunitat de treballar a la meva ciutat estimada, Girona.

A la meva família. Als meus pares, a les meves germanes i cunyats i especialment als meus nebots: en Pau, l'Andreu, en Miquel i l'Anna, per les bones estones que m'han donat. Gràcies marrecs.

Finalment a en Xevi, pel seu suport incondicional durant tots aquests anys, i pel fill que estem esperant. L'Arnau.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

APP*: proteína precursora de amiloide
BDNF*: brain derived neurotrophic factor
BHE: barrera hematoencefálica
CFA*: adyuvante completo de Freund
CP: Chlamydia pneumoniae
DE: desviación estándar
DNA*: ácido desoxirribonucleico
EAE: encefalitis autoinmune experimental
EBV*: virus Epstein-Barr
EDA: escala de estado de la discapacidad ampliada
ELISA*: análisis de inmunoadsorción ligado a enzimas
EM: esclerosis múltiple
HHV-6*: virus herpes-6
HLA*: sistema mayor de histocompatibilidad
ICAM*: molécula de adhesión intercelular
IFN: interferón
Ig: inmunoglobulina
IL: interleucina
LCR: líquido cefalorraquídeo
LPS: lipopolisacárido
LT: linfotoxina
MHC*: complejo mayor de histocompatibilidad
MSFC*: multiple sclerosis functional composite
MOG*: glicoproteína miélica oligodendroglial
NAA: N-acetil-aspartato
OPN: osteopontina
PLP*: proteína proteolipídica

Abreviaturas

PMB: proteína mielínica básica

PP: primariamente progresiva

PT: progresiva transicional

PR: progresiva recidivante

RNA*: ácido ribonucleico

RR: recurrente remitente

SNC: sistema nervioso central

SP: secundariamente progresiva

TCR*: receptor de células T

TGF*: factor de crecimiento transformador

TNF*: factor de necrosis tumoral

*: las abreviaturas con asterisco conservan las siglas de la terminología anglosajona.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
I – Características clínicas y paraclínicas de la EM	3
1 - Definición de EM	3
2 - Curso clínico de la EM	4
2.1 - Hallazgos clínicos en la EM	4
2.2 – Definición de la actividad de la enfermedad	6
2.3 – Pronóstico de la EM	15
2.3.1 – Factores pronósticos de la EM	15
2.3.2 – Evolución a la fase progresiva	15
3 - Resonancia magnética	17
4 - Líquido cefalorraquídeo	23
5 - Potenciales evocados	24
6 - Criterios diagnósticos	25
II – Etiología de la EM	29
1 - Factores genéticos	29
2 - Factores ambientales	30
III – Patogenia de la EM	32
1 - Generalidades	32
1.1 - Desmielinización	35
1.2 - Remielinización	37
1.3 – Daño axonal	38
1.4 – Efecto neuroprotector de la inflamación	39
1.5 – Heterogeneidad de las lesiones de EM	40

2 - Papel de las citoquinas en la patogenia de la EM	42
2.1 – Generalidades	42
2.2 - Osteopontina	44
2.2.1 – Generalidades	44
2.2.2 – Funciones de la OPN	45
2.2.3 – Relación con la patogenia de la EM	47
Hipótesis de trabajo	51
Objetivos	51
PACIENTES Y MÉTODO	55
Pacientes	57
I- Pacientes con EM y controles sanos	57
II- La UNIC	57
Método	58
I- Protocolo clínico	58
1- Protocolo de recogida de datos	58
II- Protocolo inmunológico	63
1- Recogida de muestras	63
2- ELISA	63
III- Protocolo de resonancia magnética	64
IV – Análisis estadístico	65

RESULTADOS	67
I - Características basales	69
Formas clínicas de EM	69
Distribución por sexos	69
Edad en el momento del estudio	70
Edad de inicio de la enfermedad	70
Edad al inicio de la progresión	71
Tiempo de evolución de la enfermedad	71
Tiempo de progresión de la discapacidad	71
EDA en el momento del estudio	73
EDA en el año previo al estudio	73
Incremento de EDA en el año previo	73
Tasa de progresión	74
Número de brotes en el año previo	74
Niveles plasmáticos de OPN	76
II - Resultados inmunológicos	78
1 - Los niveles de OPN en plasma están aumentados en la EMSP	78
2 - Aumento en la expresión de OPN en las formas EMSP que cursan a brotes	79
3 - Niveles de OPN aumentados en formas EMRR y EMSP sin progresión clínica	79
4 - Los niveles plasmáticos de OPN está aumentados en pacientes con EMRR durante el brote	84
5 - Los niveles plasmáticos de OPN no se modifican con el tratamiento con IFN-beta	86
6 - Correlación entre los niveles de OPN en las formas EMPP/EMTP y la actividad por RM	87

DISCUSIÓN	89
1 - Papel de la OPN en la patogénesis de la EAE y EM	91
2 - Papel de la OPN en la EMSP	93
3 - Diferencias en la expresión de OPN entre la EMSP y la EMPP	94
4 - Papel de la OPN en la progresión de la enfermedad	96
5 - Expresión de OPN durante el brote	99
6 - Expresión de OPN durante el tratamiento con IFN-beta	100
7 - Actividad en la RM y expresión de OPN	101
Conclusiones	105
Bibliografía	109

Introducción

I- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PARACLÍNICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

1 - Definición de esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante inflamatoria adquirida, en la que la mielina del sistema nervioso central (SNC) es el órgano diana de un proceso autoinmune. Recientemente se está resaltando la implicación del daño axonal ya en las fases iniciales de la enfermedad. Las características clínicas y patológicas fueron descritas por primera vez por Charcot en 1868, aunque sigue sin conocerse su etiología.

El término *desmielinización* se emplea para definir el daño adquirido de la mielina, cualquiera que sea la causa; mientras que el término *dismielinización* se refiere a alteraciones que afectan a los genes de los oligodendrocitos, y posiblemente otras células, los cuales codifican proteínas mielínicas, enzimas y otros importantes factores para la mielinogénesis.

Existen dos características principales de la enfermedad; la primera es la existencia en el 85% de los pacientes de un perfil temporal de síntomas que consiste en la aparición de uno o varios déficit neurológicos que acontecen en episodios, definidos como brotes, seguidos de períodos de desaparición de los síntomas, conocidos como fases de remisión. Es decir, la presencia de diseminación en tiempo. La segunda gran característica de la enfermedad es la diseminación de las lesiones anatómicas en todo el SNC, predominantemente en la sustancia blanca periventricular, cuerpo calloso, la sustancia blanca yuxtacortical, el parénquima

infratentorial y las áreas subpiales de la médula espinal. Es decir, la presencia de diseminación en espacio.

La EM es la segunda causa de discapacidad en el adulto joven y de aquí radica su importancia.

2.- Curso clínico de la EM

2.1.- Hallazgos clínicos en la EM

La EM típicamente se caracteriza por episodios de empeoramiento (llamados brotes, que indican la ocurrencia de inflamación y desmielinización) separados por períodos de remisión.

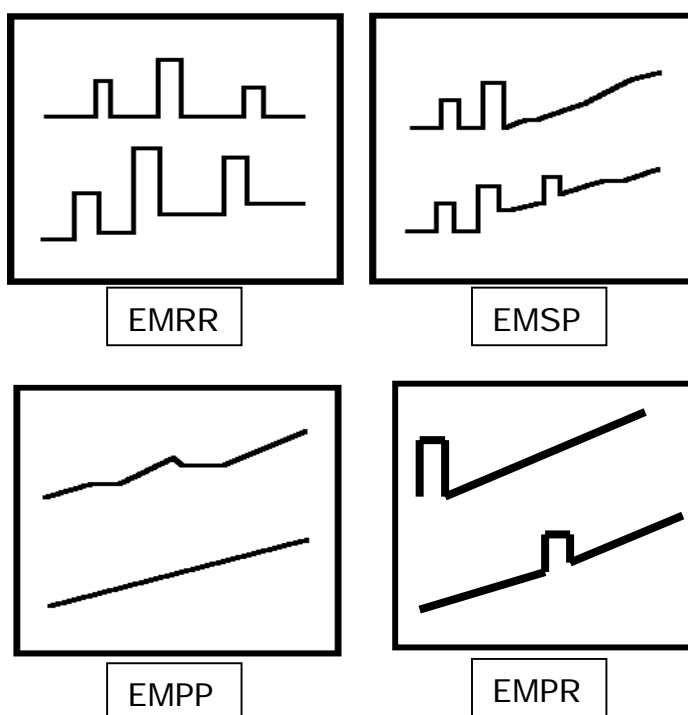
Un brote se define como la ocurrencia de síntomas de disfunción neurológica de más de 24 horas de duración. Para aceptar la existencia de dos brotes, éstos deben afectar a diferentes partes del SNC y estar separados por un periodo de al menos 1 mes¹.

Las manifestaciones clínicas más comunes incluyen neuritis óptica, debilidad muscular, trastornos sensoriales, alteraciones esfinterianas, ataxia cerebelosa, disfunción del tronco cerebral, temblor y fatiga.

Una pequeña parte de los pacientes no experimentan brotes sino que presentan una aparición gradual de déficit neurológicos, definidos como progresión, independiente de los brotes.

Existe una marcada heterogeneidad clínica entre los individuos, sin embargo la categorización de los casos de EM dentro de diferentes fenotipos clínicos tiene implicaciones terapéuticas, pronósticas y quizás patogénicas. En un esfuerzo para estandarizar la terminología utilizada se acordó en un comité internacional la siguiente clasificación²:

- EM remitente recurrente (RR). Se caracteriza por la presencia de brotes de la enfermedad claramente definidos con recuperación completa o con secuelas. No existe progresión de la enfermedad entre los brotes. El 85% de los pacientes presentan esta forma clínica.
- EM secundaria progresiva (SP). El curso inicial es RR, seguido de incremento de la discapacidad de forma progresiva con o sin brotes sobreañadidos.
- EM primaria progresiva (PP). Progresión de la enfermedad desde el inicio, con estabilizaciones ocasionales y mejorías menores temporales. No presentan brotes de la enfermedad.
- EM progresiva recurrente (PR). Enfermedad progresiva desde el inicio con brotes evidentes, con o sin recuperación completa y con períodos entre brotes caracterizados por progresión continua.



2.2 - Definición de la actividad de la enfermedad

Actividad clínica

En la práctica clínica, la valoración de la actividad clínica suele basarse en el juicio del médico, que se fundamenta en la historia clínica y en el examen neurológico centrado en los síntomas. En los ensayos clínicos controlados, las evaluaciones suelen estandarizarse en términos de tasas anuales de brotes o medidas estandarizadas de deterioro e discapacidad.

La búsqueda de una escala óptima que exprese la variabilidad en las alteraciones y discapacidades que encontramos en los pacientes con EM y que mida adecuadamente la evolución de la EM, tanto a corto plazo en ensayos clínicos, como a largo plazo, ha sido incansable en los últimos 20 años. La escala de Kurtzke o Expanded Disability Status Scale (EDSS) o escala de Estado de la Discapacidad Ampliada (EDA) y la puntuación de los Sistemas Funcionales (SF) desarrollados por Kurtzke son las medidas más ampliamente utilizadas y reconocidas en la EM³. La puntuación de dicha escala queda determinada mediante examen clínico, excepto para la determinación de la función de la vejiga urinaria y del intestino, que se realiza basándose en elementos subjetivos de la historia. Los SF incluyen los sistema piramidal, cerebeloso, sensorial, del tronco cerebral, la vejiga e intestino, el sistema visual y otros. Kurtzke señaló que algunos de ellos (piramidal, cerebeloso, sensorial y tronco cerebral) se ven afectados con mayor frecuencia que otros, y consecuentemente se refirió a estos SF como principales y a los otros como menores.

Tabla 1. Escala de EDA.

FUNCIÓN PIRAMIDAL
0- Normal 1- Signos anormales sin discapacidad. 2- Discapacidad mínima. 3- Paraparesia o hemiparesia leve o moderada, monoparesia grave. 4- Paraparesia o hemiparesia marcada, tetraparesia moderada o monoplejía. 5- Paraplegia, hemiplejía o tetraparesia severa. 6- Tetraplejía.
FUNCIÓN CEREBELOSA
0- Normal 1- Signos anormales sin discapacidad. 2- Ataxia leve. 3- Ataxia moderada del tronco o las extremidades. 4- Ataxia grave de todas las extremidades. 5- Discapacidad para realizar movimientos coordinados debido a la ataxia. V- Desconocida. X- Se añade a cada cifra cuando la presencia de debilidad dificulta el examen.
FUNCIÓN DEL TRONCO CEREBRAL
0- Normal. 1- Presencia de signos. 2- Nistagmo moderado u otra discapacidad leve. 3- Nistagmo grave, debilidad extraocular marcada o discapacidad moderada relacionada con otros pares craneales. 4- Disartria marcada u otra discapacidad significativa. 5- Discapacidad para deglutir o hablar. V- Desconocida.
FUNCIÓN SENSITIVA
0- Normal. 1- Disminución leve de la sensibilidad vibratoria y del reconocimiento táctil de figuras sobre la piel en 1 ó 2 extremidades. 2- Ligera disminución de la sensibilidad táctil, dolorosa o postural y/o disminución moderada de la sensibilidad vibratoria en 1 ó 2 extremidades o disminución leve de la sensibilidad vibratoria exclusivamente en 3 ó 4 extremidades.

- 3- Disminución moderada de la sensibilidad táctil, dolorosa o postural y/o pérdida de la sensibilidad vibratoria principalmente en 1 ó 2 extremidades o ligera disminución de la sensibilidad táctil o dolorosa y/o disminución moderada de todas las pruebas propioceptivas en 3 ó 4 extremidades.
- 4- Disminución marcada de la sensibilidad táctil o dolorosa o pérdida de la propiocepción, sola o asociadas, en 1 ó 2 extremidades o disminución moderada de la sensibilidad táctil o dolorosa y/o disminución importante de la sensibilidad propioceptiva en más de 2 extremidades.
- 5- Pérdida de la sensibilidad en 1 ó 2 extremidades como característica predominante o disminución moderada de la sensibilidad táctil o dolorosa y/o pérdida de la propiocepción en la mayor parte del cuerpo por debajo de la cabeza.
- 6- Pérdida de la sensibilidad por debajo de la cabeza como característica predominante.
- V- Desconocida.

FUNCIÓN INTESTINAL / VESICAL

- 0- Normal.
- 1- Goteo al inicio de la micción, urgencia miccional o retención urinaria de grado leve.
- 2- Goteo inicial, urgencia y retención intestinal o urinaria de grado moderado o incontinencia urinaria infrecuente.
- 3- Incontinencia urinaria frecuente.
- 4- Necesidad de sondaje prácticamente constante.
- 5- Pérdida de función vesical.
- 6- Pérdida de función vesical e intestinal.
- V- Desconocida.

FUNCIÓN VISUAL

- 0- Normal.
- 1- Escotoma con agudeza visual corregida mejor que 20/30.
- 2- Escotoma con agudeza visual máxima corregida de 20/30-20/59 en el ojo peor.
- 3- Escotoma de gran tamaño en el ojo peor ó disminución moderada en los campos, pero con una agudeza visual máxima (corregida) de 20/60 a 20/99.
- 4- Disminución significativa del campo visual con una agudeza visual máxima corregida de 20/100-20/200 en el ojo peor; grado 3 más agudeza visual de 20/60 o menos en el ojo mejor.
- 5- Agudeza visual máxima corregida menor de 20/200 en el ojo peor; grado 4 más agudeza visual máxima de 20/60 o menos en el ojo mejor.
- 6- Grado 5 más agudeza visual máxima de 20/60 o menos en el ojo mejor.
- V- Desconocida.
- V- Se añade a los grados 0-6 cuando existe palidez temporal.

FUNCIÓN CEREBRAL (o COGNITIVA)

- 0- Normal.
- 1- Alteración del estado de ánimo (sin afectar a la puntuación de la EDA).
- 2- Deterioro leve de la actividad mental.
- 3- Deterioro moderado de la actividad mental.
- 4- Deterioro marcado de la actividad mental (síndrome cerebral crónico moderado).
- 5- Demencia o síndrome cerebral crónico grave o incompetente.
- V- Desconocida.

OTRAS FUNCIONES

- 0- Ninguna.
- 1- Cualquier otro signo neurológico atribuible a la EM (especifíquese).
- V- Desconocida.

Nota

- Si un paciente camina 100 metros ó más con 2 apoyos, se considera EDA 6.
- Si deambula > 10 metros pero < 100 metros con 2 apoyos, se considera EDA 6.5
- Si requiere ayuda de otra persona (aunque unilateral) y no puede caminar > 50 metros, se considera EDA 6.5
- Si camina sin apoyo, pero necesita ayuda ocasional, se considera una EDA 6.



Escala de Estado de Discapacidad Ampliada (EDA)

- 0** Exploración neurológica normal (grado 0 en todos los SF. Se acepta función cerebral grado 1).
- 1.0** Sin discapacidad, signos mínimos en un SF (es decir, grado 1 en cualquier función que no sea la cerebral).
- 1.5** Sin discapacidad, signos mínimos en más de un SF (más de un grado 1 en cualquier función que no sea la cerebral).
- 2.0** Discapacidad mínima en un SF (grado 2 en uno de ellos y 0 ó 1 en el resto).
- 2.5** Discapacidad mínima en 2 SF (grado 2 en 2 SF y 0 ó 1 en el resto).
- 3.0** Discapacidad moderada en un SF (grado 3 en un SF y 0 ó 1 en el resto), o discapacidad leve en 3 ó 4 SF (grado 2 en 3/4 SF y 0 ó 1 en el resto), aunque con plena capacidad de deambulación.
- 3.5** Plena capacidad de deambulación con discapacidad moderada en un SF (un grado 3) y grado 2 en 1 ó 2 SF, o grado 3 en dos SF o grado 2 en 5 SF (0 ó 1 en el resto).
- 4.0** Plena capacidad de deambulación sin ayuda durante gran parte del día; capacidad de trabajar la jornada completa, no obstante presenta ciertas limitaciones para realizar una actividad plena o necesita ayuda mínima; caracterizado por una discapacidad relativamente grave consistente habitualmente en grado 4 en un SF (0 ó 1 en el resto) o una combinación de grados menores que excedan los límites de los puntos anteriores.
- 4.5** Plena capacidad de deambulación sin ayuda durante gran parte del día; capacidad de trabajar la jornada completa, no obstante presenta ciertas limitaciones para realizar una actividad plena o necesita ayuda mínima; caracterizado por una discapacidad relativamente grave consistente habitualmente en grado 4 en un SF (0 ó 1 en el resto) o una combinación de grados menores que excedan los límites de los puntos anteriores. Capaz de andar unos 300 metros sin ayuda ni descanso.
- 5.0** Capacidad de andar unos 200 metros sin ayuda ni descanso; discapacidad lo suficientemente grave como para afectar a la actividad diaria habitual (p.ej trabajar la jornada completa sin medidas especiales).(Equivalente a un grado 5 en un solo SF y 0 ó 1 en el resto o una combinación de grados menores que suelen superar las especificaciones del punto 4.0).

- 5.5** Capacidad de andar unos 100 metros sin ayuda ni descanso; discapacidad lo suficientemente grave como para impedir la actividad diaria habitual. (Equivalente a un grado 5 en un solo SF y 0 ó 1 en el resto o una combinación de grados menores que suelen superar a los del punto 4.0).
- 6.0** Necesidad de ayuda intermitente o constante unilateral (bastón, muleta o corsé) para andar unos 100 metros con o sin descanso. (Equivalente a combinaciones de más de dos grados 3+ en los SF).
- 6.5** Necesidad de ayuda bilateral constante (bastones, muletas o corsé) para andar unos 20 metros sin descansar. (Equivalente a combinaciones de más de dos grados 3+ en los SF).
- 7.0** Incapaz de andar más de 5 metros incluso con ayuda y limitado esencialmente a permanecer en silla de ruedas; capaz de desplazarse solo en la silla de ruedas y de levantarse de ella; permanece en la silla de ruedas unas 12 horas diarias. (Equivale a combinaciones de más de un grado 4+ en los SF y, muy raramente a un grado 5 de la función piramidal únicamente).
- 7.5** Incapaz de dar unos cuantos pasos; limitado a permanecer en silla de ruedas; puede necesitar ayuda para levantarse de la silla; capaz de desplazarse solo en la silla, aunque no todo el día; puede necesitar una silla de ruedas con motor. (Equivale a combinaciones de más de un grado 4+ de los SF).
- 8.0** Limitado esencialmente a estar en cama o sentado o a ser trasladado en silla de ruedas, aunque puede permanecer fuera de la cama gran parte del día; capaz de realizar gran parte del aseo personal; puede utilizar las manos eficazmente. (Equivale a combinaciones de grado 4+ en varios sistemas).
- 8.5** Limitado a permanecer en cama gran parte del día; puede utilizar parcialmente las manos y realizar algunas labores de aseo personal. (Equivale a combinaciones de grado 4+ en varios sistemas).
- 9.0** Paciente encamado e inválido; puede comunicarse y comer. (Equivale a combinaciones de grado 4+ en la mayoría de los sistemas).
- 9.5** Paciente encamado e inválido total, incapaz de comunicarse eficazmente y de comer o de deglutir. (Equivale a combinaciones de grado 4+ en casi todos los sistemas).
- 10** Muerte por EM.

La EDA es una escala con incrementos de 0,5 puntos que oscila entre 0 (examen normal) y 10 (muerte por EM). En el intervalo 1.0-4.0, las puntuaciones de la EDA queda determinada por los SF. Entre puntuaciones de 4.0 y 8.0, la escala refleja la deambulaci3n. Iniciándose en EDA 4.5, la escala evalúa tanto la distancia que puede ser recorrida como la ayuda necesaria para llevar a cabo tal tarea. En EDA 8.0-9.0, la funci3n de las extremidades inferiores se ha perdido esencialmente y la funci3n de las extremidades superiores es el principal factor a considerar, mientras en el 9.0 es la funci3n bulbar el principal determinante. En la EDA tiene un peso importante la capacidad de deambulaci3n. Las limitaciones de la EDA incluyen: a) datos poco fidedignos debido a la imprecisi3n de los t3rminos descriptivos; b) sensibilidad limitada para ser utilizada en ensayos clínicos; c) naturaleza "no lineal" y diferencias en tiempo de permanencia observado; d) énfasis en la deambulaci3n; e d) inadecuada cuantificaci3n de la funci3n mental.

La escala de EDA presenta determinadas características que conviene tener en cuenta a la hora de su manejo estadístico. En análisis transversales de la discapacidad se observa que los pacientes se agrupan alrededor de los niveles 1-3 y 6-7, siguiendo una distribuci3n bimodal más que normal⁴⁻⁵. Por otra parte, el tiempo que cada paciente permanece en cada nivel de discapacidad no es igual para cada uno de ellos, de tal forma que suelen permanecer más tiempo en grados 1,2,6 ó 7 que en grados 3,4 ó 5⁶. Dicho de otro modo: el riesgo de empeorar un punto en la EDA varía en funci3n de la EDA de base, de tal forma que los pacientes que se sitúan en una EDA de 4 tienen tres veces más probabilidades de pasar al 5 que los pacientes que están en un 2 de pasar a un 3⁷. Así pues, dado que se trata de una escala ordinal que no sigue una distribuci3n normal, el

cálculo de la media no resulta adecuado como medida de tendencia central. Para el análisis de la rapidez de aparición de la discapacidad se suele utilizar el tiempo que un determinado grupo de pacientes tarda en alcanzar un determinado grado de discapacidad mediante análisis de supervivencia. De este modo se suele estudiar por ejemplo, el tiempo que se tarda en iniciar la fase progresiva para pacientes con inicio remitente recurrente. De esta forma en las series clásicas se calcula que el 50% de los pacientes se encuentra en esta situación ($EDA \geq 6$) a los 10 años del inicio de la EM^{4,8-13}.

La búsqueda de escalas que permitan detectar cambios en un periodo corto de tiempo a lo largo del curso de la enfermedad y que valore diferentes aspectos clínicos de la EM, ha llevado en los últimos años, a la elaboración de una escala compuesta denominada escala funcional compuesta de EM (Multiple Sclerosis Functional Composite Scale - MSFC)¹⁴⁻¹⁵. La puntuación en esta escala se calcula sumando las puntuaciones Z que el paciente obtiene en tres pruebas estandarizadas; 1) el "Timed 25-foot walk" (T25W) o el tiempo para caminar 25 pasos, mide el tiempo que tarda el paciente en recorrer 7,5 metros y constituye una medida simple y útil de la movilidad; 2) el "Nine Hole Peg Test" (9HPT) que mide el tiempo para colocar y retirar 9 palitos de una caja con 9 agujeros, mide la destreza manual y es una medida cuantitativa útil de la función de la extremidad superior y 3) el "Paced Auditory Serial Addition Test" (PASAT-3) o test de 3 segundos de audición seriada en pasos, que consiste en una lista de números estandarizada y presentada de forma seriada cada 3 segundos. El paciente debe sumar correlativamente, y dar las soluciones en los intervalos entre la presentación de los números. Permite medir alteraciones cognitivas, básicamente atención y velocidad de procesamiento

Actividad en la Resonancia Magnética

La resonancia magnética (RM) es la técnica más sensible en la detección de las lesiones de la EM. Las secuencias de RM potenciadas en T1 detectan nuevas lesiones focales ponderadas en T1 (T1W) contrastadas con gadolinio (Gd+) con una frecuencia diez veces mayor que los nuevos síntomas. El contraste con gadolinio parece ser un marcador específico de la permeabilidad vascular anormal en el SNC¹⁶, y constituye un marcador específico para uno de los eventos más tempranos en la formación de nuevas lesiones en EM o en la reactivación de las lesiones previas¹⁷.

La actividad en la RM también puede determinarse contando el número de nuevas lesiones o lesiones que aumentan de tamaño en las secuencias ponderadas en T2 (T2W). Casi todas las nuevas lesiones en T1WGd+ tienen una anomalía en T2W; sin embargo, las lesiones en T2W no son tan específicas para el cambio histopatológico como las lesiones T1WGd+. Por ejemplo, las lesiones en T2W pueden estar producidas por edema focal, inflamación, desmielinización, pérdida axonal o gliosis.

2.3 - Pronóstico de la EM

2.3.1 - Factores pronósticos de la EM

El curso clínico de la enfermedad es altamente variable e impredecible. Existen diversos factores clínicos y demográficos predictores del curso clínico de la EM. Los factores predictores de una mala evolución son: género masculino, edad de inicio tardía, elevada frecuencia de brotes en los primeros años de la enfermedad y un intervalo corto de tiempo en alcanzar una discapacidad moderada.

2.3.2 - Evolución a la fase progresiva

Clásicamente se acepta que aproximadamente la mitad de los enfermos con EM a brotes alcanzan la fase progresiva de la enfermedad alrededor de los diez años de evolución aunque la mayoría de los autores encuentran una fuerte dependencia respecto de la edad de inicio^{7-8,18}. De esta forma los pacientes que inician la enfermedad antes de los 20 años de edad tardan otros 20 años en alcanzar la fase progresiva, mientras que los que la inician después de los 40 años tardan sólo unos 2,5 años¹⁹. Una vez en esta fase, la discapacidad residual progresa a una velocidad aproximada de 0,5 puntos de EDA/año, aunque como siempre, hay una gran variabilidad interindividual¹⁸.

En la serie de Minderhoud y cols, el 60% de los pacientes con EMSP alcanzaron una EDA superior o igual a 7 a los 15 años del inicio de la progresión (a los 52 años de edad), mientras que el 60% de los pacientes con forma EMPP alcanzaron este mismo grado de discapacidad a los 25 años de evolución (a los 60 años de edad)²⁰. Este mismo autor encuentra que la progresión de la discapacidad en la fase progresiva fue ligeramente mayor en los pacientes con formas EMSP, así como en mujeres, pacientes con mayor número de brotes en la fase remitente-recurrente y en los que tenían mayor edad en el momento del inicio de la progresión.

En el estudio de Confavreux y cols, con 1844 pacientes con EM, encontraron que el tiempo medio desde el inicio de la enfermedad hasta alcanzar una EDA de 4, de 6 y de 7 era mayor en los pacientes con EMRR (11,4, 23,1 y 33,1 años, respectivamente) que en los pacientes con una enfermedad progresiva desde el inicio (0,0, 7,1 y 13,4 años, respectivamente; $p < 0.001$). En cambio, el tiempo transcurrido desde la asignación de una EDA de 4 hasta una puntuación en la escala de 6 era similar en ambos grupos (5,7 y 5,4 años, $p = 0.74$). Por tanto, concluyen que en los pacientes con EM, la presencia de brotes no influye en la progresión de la discapacidad irreversible²¹.

3 - Resonancia magnética en la EM

La resonancia magnética (RM) es la técnica más sensible en la detección de las lesiones de la EM, ya que detecta lesiones de características desmielinizantes, al menos, en el 95% de pacientes con esclerosis múltiple clínicamente definida (EMCD). Como consecuencia de esta alta sensibilidad, la RM se ha convertido en una técnica esencial no sólo en el diagnóstico de la EM sino también como marcador pronóstico en la fase inicial de la enfermedad, además de contribuir tanto en la mejor comprensión de su historia natural como en la evaluación de la eficacia de nuevos tratamientos²².

Características de las placas de EM

Todas las placas de EM se muestran, con independencia de su substrato patológico o fase evolutiva, hiperintensas en las secuencias potenciadas en densidad protónica y T2, de la misma forma que lo hacen gran parte de los procesos patológicos que afectan el parénquima cerebral. Esta hiperintensidad, traduce simplemente un aumento en la concentración tisular de agua libre, pero no refleja la contribución del edema, desmielinización, inflamación, lesión axonal, gliosis o remielinización en la composición de la placa²³.

Típicamente las lesiones visibles en las secuencias potenciadas en T2 son múltiples y de pequeño tamaño, aunque en ocasiones alcanzan gran tamaño debido a la confluencia lesional o a la existencia de lesiones seudotumorales²⁴. Las lesiones tienen predisposición a situarse en determinadas zonas anatómicas, como la sustancia blanca periventricular (sobre todo la posterior), cuerpo calloso, la sustancia blanca yuxtacortical y el parénquima infratentorial.

La detección de lesiones en el parénquima infratentorial contribuye de forma significativa al incremento de la especificidad diagnóstica de la RM en la EM²⁴⁻²⁵.

Las lesiones en la médula espinal adoptan, con frecuencia, una morfología ovoidea con su eje mayor orientado craneocaudalmente, y una predisposición a situarse periféricamente y a afectar los cordones posteriores. Las lesiones no suelen sobrepasar dos cuerpos vertebrales en su extensión craneocaudal, ni más del 50% del área transversal, localizándose la mayoría de ellas en los segmentos cervical o dorsal superior²⁶⁻²⁷. En aproximadamente el 50% de los pacientes con una EMCD y con un examen de RM cerebral normal, se identifican lesiones medulares compatibles con placas desmielinizantes, por lo que un estudio medular completo está indicado en pacientes con EMCD cuando el estudio craneal sea normal o con lesiones poco específicas²⁸. Nuestro grupo analizó 38 pacientes con un síndrome medular aislado y evaluó el riesgo de conversión a EMCD. Observamos que la RM medular fue patológica en el 89% de los pacientes y la RM craneal en el 66%. El riesgo de conversión a EMCD era mayor en aquellos pacientes con lesiones medulares cervicales, de localización marginal y de diámetro inferior a 2 cm²⁹.

Criterios de resonancia magnética para la EM

Se han propuesto tres criterios diferentes de RM en el diagnóstico de la EM. Los criterios descritos por Paty et al³⁰ se definieron con el propósito de predecir la conversión a EMCD en pacientes que sufrieron un síntoma inicial compatible con un primer brote de EM, mostrando una elevada sensibilidad pero una moderada especificidad. Los criterios de Fazekas et al²⁴ se obtuvieron de forma retrospectiva en pacientes con la enfermedad establecida, y su

objetivo inicial fue separar las alteraciones propias de la EM de las que se identifican de forma incidental en la población adulta, alcanzando una elevada especificidad en este propósito pero perdiendo eficacia cuando se aplican en el diagnóstico inicial de la enfermedad. Barkhof et al²⁵ desarrollaron un modelo dicotomizado de cuatro parámetros basado en un análisis de regresión logística, que predice la conversión a EMCD en pacientes con un síndrome neurológico aislado sugestivo de proceso desmielinizante.

TABLA 2A .- Criterios diagnósticos de RM en la EM

Paty et al (1): Presencia de cuatro lesiones (T2) o tres lesiones si una es periventricular.

Fazekas et al (2): Presencia de tres lesiones (T2), con dos de las siguientes propiedades: infratentorial, periventricular, y tamaño superior a 6 mm.

Barkhof et al (3): Modelo de probabilidad acumulativa de conversión a EM en función de la presencia de las siguientes características: al menos una lesión que se realza con gadolinio (o nueve lesiones visibles en T2); al menos una lesión infratentorial; al menos una lesión yuxtacortical; al menos tres lesiones periventriculares.

(1) Paty et al. Neurology 1988;38:180-185.

(2) Fazekas et al. Neurology 1988;38:1822-1825

(3) Barkhof et al. Brain 1997;120:2059-2069

Técnicas de RM

Las técnicas clásicas de RM son las secuencias potenciadas en T2 y las secuencias potenciadas en T1 con gadolinio.

En las secuencias potenciadas en T2 la hiperseñal que producen las lesiones desmielinizantes reflejan un aumento de la concentración de agua, pero su substrato patológico varía en función de su fase evolutiva. A pesar de su limitada especificidad en la determinación del substrato lesional, las secuencias potenciadas en T2 son de utilidad en el estudio de la historia natural de la EM, siendo las más utilizadas en el estudio de la EM, por su elevada sensibilidad y simplicidad técnica. El número y volumen de las lesiones visibles en T2 se relaciona con la duración y fase clínica de la enfermedad, y con el grado de discapacidad clínica permanente³¹. Así la carga lesional suele ser mínima al inicio de la fase remitente recurrente y máxima en fases avanzadas de las formas secundarias progresivas.

La utilización de secuencias potenciadas en T1 en combinación con la inyección de contraste paramagnético (gadolinio-DTPA) permite identificar de forma selectiva las lesiones con actividad inflamatoria³². El gadolinio, en condiciones normales, no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), sin embargo cuando existe una alteración en la permeabilidad de la barrera, el gadolinio la atraviesa y produce un acortamiento del T1 (hiperintensidad) en el tejido adyacente³²⁻³³.

Existen nuevas técnicas de RM para la caracterización del substrato histopatológico lesional: lesiones hipointensas en secuencias potenciadas en T1; espectroscopía por resonancia magnética de protón; transferencia de magnetización y cuantificación del volumen cerebral y del área medular cervical.

Alrededor del 10-20% de las lesiones visibles en densidad protónica/T2 se identifican en las secuencias potenciadas en T1 en forma de hiposeñal con relación a la sustancia blanca normal. Esta hiposeñal probablemente refleja un substrato patológico diferente en función que la lesión sea activa o crónica. En las lesiones activas, refleja la presencia de edema y grados variables de destrucción tisular, y su hiposeñal puede desaparecer o al menos reducirse en intensidad y tamaño cuando se resuelve el proceso inflamatorio. En las placas crónicas, la hiposeñal es persistente y refleja la presencia de destrucción tisular irreversible.

La espectroscopía por resonancia magnética de protón (^1H -ERM) es una técnica que permite determinar *in vivo* la concentración de diferentes metabolitos en regiones determinadas de un tejido. En el tejido cerebral normal, la ^1H -ERM pone de manifiesto resonancias atribuidas principalmente al N-acetilaspártato (NAA), creatina y fosfocreatina (Cr) y a compuestos que contienen colina (Cho). La ^1H -ERM es capaz de detectar las alteraciones bioquímicas que caracterizan la inflamación, desmielinización, gliosis y daño axonal³⁴.

La transferencia de magnetización (TM) es una técnica de RM que genera una forma de contraste diferente a las técnicas clásicas basadas en los tiempos de relajación longitudinal (T1) y transversal (T2) y cuyo mecanismo básico se fundamenta en el intercambio de magnetización entre los núcleos de hidrógeno que forman parte del agua libre y los que forman parte del agua ligada a macromoléculas o de sus propios grupos hidroxilo³⁵. Entre estas macromoléculas cabe destacar el colesterol, que es un componente cuantitativamente importante de la mielina. Esta técnica, por tanto, ofrece un mapa indirecto de la concentración de mielina en el parénquima encefálico.

La cuantificación del volumen cerebral y, por tanto, del grado

de atrofia cerebral tiene una estrecha correlación con el grado de disfunción clínica. Estudios longitudinales demuestran que el grado de atrofia progresa en algunos pacientes, y que esta progresión se correlaciona con un empeoramiento del estado clínico³⁶. La valoración de la atrofia medular parece ser especialmente útil en el establecimiento de correlaciones clínicas significativas en las formas primariamente progresivas, sobre todo si han presentado al inicio clínica medular, ya que en estos pacientes la carga lesional cerebral medida en T2 es cuantitativamente menor que en otras formas clínicas de la enfermedad.

4 - Líquido cefalorraquídeo

El líquido cefalorraquídeo (LCR) en la EM es de aspecto macroscópico normal. El número de células es inferior a 50 en la mayoría de los pacientes. Las proteínas totales son normales o están ligeramente elevadas. Un hallazgo característico es la elevación relativa de las inmunoglobulinas (Ig) especialmente la IgG, implicando síntesis intratecal. Así mismo, también es característica la presencia de bandas oligoclonales (BOC) en el LCR. La técnica más sensible es el isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida, que permite detectar BOC en el 95% de los casos. De todas formas, existen falsos positivos, pudiendo aparecer en algunas otras enfermedades, como panencefalitis esclerosante subaguda, infecciones virales, infecciones crónicas del SNC, síndrome de Guillain-Barré e ictus, entre otros³⁷.

En los nuevos criterios diagnósticos de McDonald¹ recomiendan que el estudio de LCR deberá considerarse principalmente cuando los criterios de RM sean menos claros, es decir, cuando no existan al menos tres de cuatro criterios de Barkhof. También se recomienda su estudio cuando la presentación clínica sea atípica, y es fundamental en el diagnóstico de la forma EMPP. En el LCR se podrán considerar tanto la presencia de BOC como un aumento del índice de IgG. La determinación de BOC deberá hacerse de forma simultánea en suero y LCR por isoelectroenfoque en gel de agarosa más inmunoblotting. Se considerará la presencia de BOC positivas cuando existan dos o más bandas de IgG en LCR, no presentes en suero. Por último, nos aporta una consideración muy importante y que implica directamente a los clínicos que realizamos el diagnóstico, a saber, que es obligación del médico que utiliza estos parámetros en el LCR para el diagnóstico,

el asegurarse de que estas determinaciones se han realizado siguiendo las recomendaciones técnicas antes especificadas.

Nuestro grupo ha estudiado el papel de las BOC en la evolución de la enfermedad, analizando todos los pacientes de nuestra unidad que se les practicó una determinación de BOC entre 1997 y 2000. En un total de 415 pacientes, un 14% no tenían BOC y su evolución fue mejor, con menos discapacidad transcurridos 10 y 15 años de la enfermedad³⁸.

5 - Potenciales evocados

Los potenciales evocados (PE) son potenciales eléctricos generados en el SNC tras la estimulación de un órgano sensitivo/sensorial periférico. Los PE pueden usarse para evaluar la conductividad de los impulsos eléctricos a través de vías de fibras nerviosas mielinizadas en el SNC. Las vías de fibras nerviosas que se estudian con más frecuencia son la visión (PE visuales), la audición (PE auditivos) y la sensibilidad (PE somatosensoriales). Los más útiles son los PE visuales por su mayor sensibilidad (85%), seguidos de los PE somatosensoriales (75%), siendo los menos sensibles los PE auditivos (60%).

En los nuevos criterios de McDonald¹ se recomienda utilizar únicamente los PE visuales, dada la dificultad que existe en muchas ocasiones para la utilización de los PE auditivos y de los PE somestésicos en el diagnóstico de la EM. Estos podrán ser utilizados para demostrar diseminación en espacio y tiempo, siendo característico el aumento de latencia de la onda P100 cuando la forma de la onda esté preservada.

6 - Criterios diagnósticos

El diagnóstico de la EM es esencialmente clínico, y se fundamenta en la demostración de episodios inflamatorio-desmielinizantes diseminados en tiempo y espacio, siempre y cuando se excluyan de forma razonable otros procesos que pudieran simular episodios neurológicos recurrentes. Sin embargo, la confirmación definitiva de la EM se basaría en la demostración de múltiple áreas de lesiones inflamatorias con desmielinización ("placas") en el SNC. No existe ningún hallazgo clínico o prueba diagnóstica que por sí misma sea suficiente para establecer el diagnóstico definitivo de la EM.

Los criterios diagnósticos más utilizados en los últimos 20 años son los establecidos por Poser et al en 1983, que combinan los hallazgos clínicos con pruebas paraclínicas, como el análisis del LCR y estudios neurofisiológicos³⁹. Estos criterios diagnósticos exigen que los signos o síntomas clínicos estén separados en el tiempo por uno o más meses, y que se atribuyan a más de una localización en la sustancia blanca del SNC. Si todos los signos o síntomas pueden asociarse a una lesión única, pueden utilizarse pruebas paraclínicas para demostrar la presencia de lesiones en el SNC que sean clínicamente silentes y que no causen los síntomas. La RM no se incluyó en dichos criterios ya que en el año 1983 esta técnica no estaba suficientemente desarrollada en el campo clínico. Con la progresiva implantación de la RM como técnica diagnóstica en múltiples procesos neurológicos, se constató la elevada sensibilidad de esta técnica en la detección de lesiones desmielinizantes.

Recientemente McDonald y cols. han propuesto unos nuevos criterios diagnósticos para la EM en los que por primera vez se integra de forma directa la RM en el esquema diagnóstico¹. Estos nuevos criterios se fundamentan en los conceptos esenciales de los criterios diagnósticos de Poser, en los que el diagnóstico de la enfermedad se puede establecer cuando existe evidencia objetiva de diseminación en tiempo y espacio de las lesiones desmielinizantes en el SNC. En los nuevos criterios de McDonald, la RM adquiere un papel principal y permite utilizar la RM para establecer diseminación de la enfermedad en tiempo y espacio. Por tanto los nuevos criterios permiten realizar el diagnóstico de EM tras un primer brote de la enfermedad.

TABLA 3. Criterios de McDonald

Criterios para la demostración de diseminación temporal de las lesiones

RM realizada al menos tres meses después del inicio del cuadro clínico:

- a) Presencia de al menos una lesión que se realce con gadolinio (sin relación con la clínica del episodio inicial).
- b) Presencia de una nueva lesión en T2 no visible en una RM comparada con otra efectuada al menos tres meses antes.

Criterios de RM para la demostración de diseminación espacial de las lesiones

- 1.- Presencia de tres o cuatro de los criterios de Barkhoff et al.
- 2.- Presencia de al menos dos lesiones subclínicas asociadas a alteraciones del líquido cefalorraquídeo (bandas oligoclonales positivas o incremento del índice IgG)

Dado que los nuevos criterios de McDonald permiten establecer diseminación en tiempo y espacio, mediante la RM, en los primeros episodios sugestivos de EM, nuestro grupo evaluó la eficacia de dichos criterios en los primeros brotes. Tintoré y cols. aplicaron los nuevos criterios a una muestra (n=139) de primeros brotes y encontraron que los nuevos criterios tenían una sensibilidad del 74%, una especificidad de 86% con una precisión global del 80% para predecir la conversión a EMCD⁴⁰.

En el año 2000, Thompson y cols. publicaron los criterios diagnósticos para las formas clínica EMPP⁴¹. Hasta entonces, los criterios de Poser no contemplaban directamente el diagnóstico de la EMPP y se hacía imperioso que se formularan unos criterios con las miras puestas principalmente en la elaboración de ensayos clínicos. Los nuevos criterios de McDonald incorporan los criterios de Thompson y cols en su esquema diagnóstico.

TABLA 4. Criterios diagnósticos de la EMPP

EMPP DEFINIDA

- 1- Progresión clínica de al menos 1 año Y:
- 2- LCR positivo Y:
- 3- RM positiva O; RM equívoca Y retraso de los PEV.

EMPP PROBABLE

Si:

- 1- Progresión clínica de al menos 1 año Y:
- 2- LCR positivo Y:
- 3- RM equívoca O: retraso de los PEV.

ó:

- 1- Progresión clínica de al menos 1 año Y:
- 2- RM positiva O: RM equívoca Y retraso de los PEV.

EMPP POSIBLE

- 1- Progresión clínica de al menos 1 año Y:
- 2- RM equívoca O retraso de los PEV.

Criterios de RM:

- 1) Nueve lesiones cerebrales
- 2) Dos lesiones en la médula espinal, o
- 3) De 4 a 8 lesiones cerebrales y una lesión en la médula espinal.

Nuestro grupo evaluó el cumplimiento de los nuevos criterios diagnósticos de la EMPP a una población de enfermos con EMPP bien estudiados y seguidos en la unidad⁴². Encontramos que el 93.7% de los pacientes cumplían los criterios de EMPP definida. El resto cumplían los criterios de EMPP probable, dado que tenían más de 9 lesiones cerebrales, presentaban una progresión clínica de más de 1 año de evolución, pero no se observaban BOC en el LCR.

II - ETIOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Se sospecha que las placas en la EM son consecuencia de un ataque inmunomediado dirigido contra uno o más antígenos del SNC. A pesar de que las evidencias sugieren que la etiología de la enfermedad incluye factores genéticos y ambientales, los intentos de aislar un gen único o un microorganismo infeccioso han fracasado.

1 - Factores genéticos

Estudios epidemiológicos han establecido que la susceptibilidad a la EM se debe en parte a factores genéticos. Al compararse con la población general, los parientes más cercanos de pacientes con EM muestran un aumento de 20-40 veces del riesgo de desarrollar una EM. Puesto que la concordancia de la enfermedad en gemelos monozigotos sólo es del 25%-30%, no se puede explicar fácilmente la vulnerabilidad en función de la herencia de un único gen. En la actualidad, se cree que es más probable que la vulnerabilidad sea fruto de la herencia poligénica⁴³.

Diversos estudios han evidenciado la asociación que existe entre la EM y diferentes *loci* incluyendo la región variable de la cadena pesada de las Ig, los *loci* de la cadena α y β del receptor de célula T y el gen de la proteína mielínica básica (PMB), aunque la única asociación inequívoca es con los genes del HLA de clase II. Diferentes estudios en pacientes caucásicos de descendencia europea septentrional muestran una fuerte asociación entre la EM y genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en especial con el haplotipo DR2 más común en caucásicos DRB1*1501-

DQB1*0602 en el cromosoma 6p21⁴⁴. No se conoce con certeza el mecanismo subyacente de esta asociación. Sin embargo, la susceptibilidad puede guardar relación con la capacidad de estas moléculas para presentar antígenos a las células T posiblemente reactivas. Nuestro grupo analizó la asociación de distintos alelos que confieren susceptibilidad para la enfermedad en familias de EM españolas, encontrando una asociación significativa con el HLA-DR2 pero no con otros alelos DR o DQ⁴⁵.

Estudios realizados en la población de Cerdeña han mostrado una asociación entre la EM y DR4 y otros estudios realizados en Escandinavia han evidenciado que la EMPP y la EMRR están asociados con 2 haplotipos diferentes del HLA de clase II: DR4, DQA1*0301, DQB1*0302 con la EMPP y DR3 (DRw17), DQA1*0501, DqB1*0201 con la EMRR⁴⁶. Estos resultados, aunque sin confirmar, sugieren una heterogeneidad inmunogenética en la EM.

2 - Factores ambientales

Se ha postulado que la EM puede estar causada por un microorganismo infeccioso, dado que algunos virus pueden producir desmielinización en el SNC y a que se ha documentado como mínimo una epidemia geográficamente aislada de EM. Sibley y cols. comunicaron que determinadas infecciones víricas de las vías respiratorias superiores se siguen de brotes de EM⁴⁷. Nuestro grupo evaluó los niveles de anticuerpos contra el virus herpes 6 (HHV-6), el virus Epstein-Barr (EBV) y la Chlamydia pneumoniae (CP) en el suero de pacientes con EM y primeros brotes. Encontramos una asociación entre la IgM HHV-6 y los pacientes con primeros brotes y

fases iniciales de EMRR, comparado con un grupo control y con pacientes con EMSP. Además en este grupo de pacientes, también estaba aumentada la IgG anti EBV. Sin embargo no se encontró ninguna asociación entre EM y la CP⁴⁸.

Por tanto, la demostración de la homología de secuencias de aminoácidos entre determinados virus, bacterias y mielina del SNC sugiere que los antígenos péptídicos procedentes de microorganismos infecciosos podrían desencadenar un ataque inmunomediado contra la mielina del SNC. En un modelo de ese tipo, los antígenos de los microorganismos infecciosos serían presentados a las células T fuera del SNC por células presentadoras de antígenos como los macrófagos, las células dentríticas o las células B en el contexto de las moléculas de clase II del MHC. A continuación, las células T activadas identificarían e iniciarían un ataque inmunomediado contra los antígenos de mielina durante la vigilancia de rutina del SNC. Como alternativa, los "superantígenos exógenos" liberados durante las infecciones podrían activar de forma indiscriminada las células T específicas para la mielina. Sin embargo, el origen exacto de la activación de las células T en la EM sigue siendo hipotético.

III - PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

1 - GENERALIDADES

La patogenia de la EM se desconoce; aunque parece ser de índole inmunológica. La hipótesis patogénica más aceptada es que la EM es fruto de la conjunción de una determinada predisposición genética y un factor ambiental, probablemente viral, que originarían una alteración en la respuesta inmune, de tipo autoinmune, que a su vez, sería la causante de la inflamación y desmielinización propias de la enfermedad⁴⁹⁻⁵⁰.

Se ha postulado la hipótesis que, en pacientes con EM, las células T que "inspeccionan" habitualmente el SNC en busca de antígenos extraños pueden encontrar antígenos del SNC que comparten epítomos con los antígenos víricos o bacterianos identificados sistémicamente. En consecuencia, estas células T reactivas inician una cascada de eventos, incluida la liberación de citoquinas proinflamatorias que intervienen en la formación de placas en la EM. Sea cual sea la causa, un hecho temprano es el paso de los linfocitos T al SNC. La localización cercana de las placas de desmielinización a los vasos sanguíneos especialmente a las vénulas, ha sido confirmado de forma repetida⁵¹. En el cerebro, el endotelio difiere del de otros tejidos en que tiene uniones continuas herméticas y moléculas transportadoras especializadas. El endotelio y los pies de los astrocitos asociados forman una barrera que restringe el paso de moléculas de gran tamaño al interior del cerebro. En consecuencia, los niveles de Ig en el cerebro están por debajo del 1% del nivel plasmático, esto también se cumple para la mayoría de los componentes del complemento. El endotelio controla también el

tráfico de linfocitos al interior del SNC, que es bajo en comparación con otros tejidos. Sin embargo, los linfocitos activados sí poseen capacidad de penetración. Para el paso de los linfocitos activados desde la sangre al SNC se precisa la interacción de las moléculas de adhesión expresadas en la superficie del linfocito con las del endotelio vascular. Las selectinas imprimen un movimiento rotatorio a los linfocitos sobre la pared vascular, mientras que al actuar las integrinas, aquéllos se fijan y atraviesan la pared. En el cerebro normal existe una expresión baja de un receptor de integrinas, la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1)⁵²⁻⁵³, en cambio en las placas de EM la expresión de ICAM-1 es mayor. Las células T con receptores específicos se unen al complejo MHC-antígeno, un evento que aumenta la expresión de moléculas de adhesión de superficie que facilitan la adhesión de células T a receptores en las células endoteliales vasculares. Las células T adherentes liberan proteasas que facilitan la transmigración a través de la membrana subendotelial vascular hacia el interior del SNC. Cuando un linfocito T específico entra en el SNC y el proceso inflamatorio ha comenzado, se produce una amplificación de la respuesta inflamatoria, y una mayor apertura de la BHE. La pérdida de integridad de ésta permite no sólo el paso de nuevos linfocitos T, sino también de los linfocitos B y factores solubles, algunos de los cuales son tóxicos para la mielina.

Las quimiocinas son factores solubles cuya principal función es la atracción de leucocitos, controlando su migración de la sangre a los tejidos inflamados. También inducen la activación y aumentan la expresión de integrinas leucocitarias, facilitando su adhesión al endotelio y posterior trasvase al tejido inflamado. En un estudio reciente de nuestro grupo se analizó la expresión de receptores de quimiocinas en las distintas formas clínicas de EM⁵⁴. Se analizó la

expresión de membrana de un grupo de quimiocinas (RANTES e IP-10) y receptores de quimiocinas (CCR1, CCR5, CXCR3 y CXCR4) en sangre periférica de 68 pacientes con EM (25 EMPP, 23 EMSP y 20 EMRR) y 26 CS. Además se obtuvieron muestras de LCR de 30 pacientes con EM y 11 pacientes con otras enfermedades no inflamatorias, como grupo control. Encontramos un aumento significativo de la expresión en superficie de CCR5 en las células CD4+, CD8+, CD19+ y CD14+, así como un aumento en el porcentaje de células CXCR3+ y CXCR4+ en la población de monocitos (CD14+). También se observó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia media de CXCR3, CCR1 y CCR5 en células CD14+ en la EM comparado con el grupo control. Las quimiocinas CXCL10 (IP-10) y CCL5 (RANTES) estaban aumentadas en el LCR de pacientes con EM comparado con el de pacientes con otras enfermedades no inflamatorias. Sin embargo, no observamos un patrón diferente de expresión de quimiocinas y de sus receptores en las distintas formas clínicas. Estos resultados apoyan la teoría que las quimiocinas y sus receptores están involucrados en la patogenia de la EM.

En las placas de EM existe una acumulación de linfocitos T, particularmente en las asociadas con desmielinización activa. Existe cierta controversia sobre la relativa preponderancia de los linfocitos CD4 "helper"/"inducer" y de los CD8 citotóxicos/supresores en las placas en los diferentes estadios de su formación y maduración⁵⁵. Y aunque se ha considerado generalmente que la EM es una enfermedad autoinmune mediada por células T, el papel de las células B y su secreción de anticuerpos es muy importante. Las células B penetran en el SNC a través de la BHE dañada en estadios tempranos de un ataque de EM. La ruptura de la BHE también

permite la circulación de anticuerpos. Estudios histopatológicos de las lesiones de EM han demostrado la presencia de anticuerpos dirigidos contra la PMB, la proteína proteolipídica (PLP) y la glicoproteína mielínica oligodendroglial (MOG)⁵⁶. Los anticuerpos pueden inducir activación del complemento, esto conduce a una atracción de las células microgliales, las cuales fagocitarán los oligodendrocitos. Hay evidencias que sugieren la formación de complejos de complemento que atacan la membrana en el SNC consumiendo el C9 terminal en la EM⁵⁷. Por tanto, los complejos inmunes que fijan al complemento pueden estar fuertemente asociados con los procesos desmielinizantes.

1.1 - Desmielinización

La célula responsable de la elaboración y el mantenimiento de la mielina en el SNC es el oligodendrocito, y en el sistema nervioso periférico su función la realiza la célula de Schwann. En la sustancia blanca normal, la mielina es el componente principal y constituye alrededor del 25% del peso seco cerebral. Cada capa de mielina es elaborada alrededor de un segmento del axón por arrastre en espiral desde una única prolongación del oligodendrocito. Esto da lugar a un internodo de mielina con cada terminación delimitada por un nódulo de Ranvier. El inicio y final de la mielinización se cree que obedece a señales neuronales⁵⁸.

La citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos es una de las explicaciones más probables del proceso de desmielinización. Un linfocito T activado puede dañar directamente el oligodendrocito o su mielina. Las células T también reclutan y estimulan las células microgliales, las cuales expresan tanto antígenos HLA clase I como II, y tienen receptores de citoquinas (incluyendo el IFN-gamma), complemento y Fc de las Igs. Los linfocitos T activados liberan citoquinas y mediadores que sirven para perpetuar el ataque inmunológico sobre la mielina.

La desmielinización puede ocurrir también como un efecto secundario, por un daño inducido por factores solubles. Por ejemplo, el TNF-alfa es liberado por las células T activadas y se encuentra en concentraciones elevadas en las placas de pacientes con EM⁵⁹, y la inyección de TNF-alfa en nervio óptico de ratones causan desmielinización⁶⁰. La concentración de TNF-alfa en el LCR de pacientes con EM se ha correlacionado con la progresión de la enfermedad y la severidad en al menos un estudio⁶¹. Otro grupo de factores solubles liberados por los linfocitos T son las perforinas, que mediante la producción de poros permiten un aumento de calcio intracelular y apoptosis de las células. Este agente derivado de las células T puede dañar a oligodendrocitos en cultivo de una forma reversible⁶².

Los linfocitos T activados también producen TNF-beta, nuevamente encontrado en concentraciones altas en las lesiones de EM, que induce apoptosis (muerte celular programada) en cultivos de oligodendrocitos. Este podría ser otro mecanismo potencial para el daño de la mielina⁶³.

1.2 - Remielinización

En las lesiones agudas se produce remielinización; sin embargo, sólo se llegan a producir unas capas delgadas de mielina, dando lugar a las llamadas "shadow plaques". Este término se acuñó para definir un área, en general perivascular, formado por láminas de mielina que se tiñen de manera pálida y está situada en la sustancia blanca intacta o rodeando el borde externo de una placa de desmielinización. Lassman comunicó que estas "placas en sombra" están compuestas por axones con una mielina muy fina⁶⁴.

La remielinización no es homogénea y varía en función de múltiples factores. Se ha comprobado que algunas placas se remielinizan en su totalidad, mientras que otras lo hacen de forma muy reducida. Además, existe una gran variabilidad interindividual. En fases iniciales de la enfermedad algunos individuos tienen los oligodendrocitos preservados mayoritariamente mientras que otros los han perdido de forma muy pronunciada. En los primeros se puede llevar a cabo una remielinización rápida y completa y desde el punto de vista histológico en ellos podremos ver un gran número de "placas en sombra". Estas diferencias interindividuales podrían justificarse, entre otros motivos, por factores genéticos. El grado de remielinización también depende del momento de formación de la placa; si se forman en las fases iniciales de la enfermedad, la remielinización será mayor que si lo hace en estadios más tardíos de EM crónica⁶⁵. La célula precursora de oligodendrocitos es la célula progenitora O2A; esta célula persiste en el SNC del adulto, y aunque en un grado limitado, es responsable de la remielinización. La remielinización puede ser incompleta porque ataques repetidos de

desmielinización deplecionen las células O2A. También factores micro-ambientales, posiblemente mediados por citoquinas, inhiben la migración de las células O2A a la lesión. Ciertamente, la hiperplasia de astrocitos bloquea la migración y la remielinización. También es posible que oligodendrocitos nuevos y la mielina no puedan sobrevivir en ausencia de unos factores de crecimiento apropiados.

1.3 - Daño axonal

En daño axonal ha despertado en los últimos años el interés de los científicos, al descubrir que el daño axonal parece estar en relación con la progresión de la discapacidad de los pacientes afectados por EM más que la propia actividad inflamatoria y desmielinizante per sé. Las evidencias de que se puede producir lesión axonal significativa desde estadios tempranos en la EM han venido en dos sentidos diferentes⁶⁶⁻⁶⁹. Por una parte, el desarrollo de nuevas técnicas para estudiar este daño axonal en estudios anatómo-patológicos y por otro la aplicación de las modernas técnicas de RM, tanto de imagen como de espectroscopía, en donde se estudian químicamente los tejidos.

En cuanto a los estudios patológicos, en 1997 se descubrió una acumulación importante de proteína precursora de amiloide (APP) en lesiones agudas de pacientes con EM y en el borde de lesiones crónicas activas, y poca o casi ninguna en las lesiones crónicas inactivas⁶⁷. Así mismo, cuando se comparó la distribución de estos acúmulos con la de los macrófagos se observó que era muy similar, lo que sugería que se relacionaba estrechamente con la inflamación. La APP es una proteína que se expresa sólo en caso de interrupción del

flujo axonal normal y, por tanto, constituiría una medida de la funcionalidad de los axones dentro de la placa de EM. Posteriormente, en 1998⁶⁸, se describió, mediante la utilización de anticuerpos antineurofilamentos no fosforilados, que el daño axonal ocurre de forma temprana en la evolución de la lesión y que se produce una transección axonal completa, y se estimó que la densidad de dichos axones era menor en la periferia de las lesiones crónicas que en las activas, y aún menor en su centro.

En cuanto a los estudios mediante RM, fue en 1990 cuando se relacionaron por primera vez las lesiones hipointensas en RM potenciada en T1 (los denominados agujeros negros o "black holes") con la progresión de la enfermedad y el grado de discapacidad. Posteriormente se ha visto que estos agujeros negros se corresponden anatómo-patológicamente con daño axonal. Así mismo, se han relacionado otros parámetros con la pérdida axonal, como el grado de disminución del diámetro medular espinal, la atrofia cerebral o el tamaño del cuerpo calloso.

1.4- Efecto neuroprotector de la inflamación

En el año 2000 se demostró que células específicas frente a la PMB pueden tener un efecto neuroprotector⁷⁰, al observar que los linfocitos T y otras células del sistema inmunitario eran capaces de producir factores neurotróficos. Recientemente se demostró la expresión de BDNF (brain derived neurotrophic factor) por células del sistema inmunitario. La importancia del BDNF en la regulación de la supervivencia y diferenciación de poblaciones neuronales, incluyendo neuronas sensoriales, cerebelosas y motoras espinales, ha sido

firmemente establecida. También se ha demostrado que células T, células B y monocitos activados secretan BDNF. Este BDNF es bioactivo y mantiene la supervivencia neuronal *in vitro*. Por tanto, este hallazgo cambiaría el concepto del papel exclusivamente nocivo de la inflamación. La identificación de esta función neuroprotectora del sistema inmunitario puede tener importantes consecuencias a la hora de diseñar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EM y otras enfermedades del SNC. Dado que parece probable que los tratamientos inmunosupresores inespecíficos que se han utilizado para el tratamiento de la EM eliminan a las células autoinmunes neuroprotectoras.

1.5 - Heterogeneidad de las lesiones de EM

Lucchinetti y cols. realizaron un estudio anátomo-patológico en una muestra amplia de pacientes con EM activa y demostraron que las lesiones de EM son heterogéneas⁷¹. Estos autores clasificaron las lesiones en 4 grupos en función de la disminución de proteínas de la mielina, extensión y topografía de la placa, patrón de destrucción del oligodendrocito y presencia de Ig y complemento. A pesar de que los linfocitos y macrófagos predominan en todos los casos, las lesiones se pueden agrupar entre las que serían similares a las existentes en la EAE (patrón I y II) y las que muestran signos de distrofia de los oligodendrocitos (patrón III y IV). Respecto a los mecanismos de desmielinización, si bien parece claro que en el patrón II predominaría la desmielinización mediada por anticuerpos, en el patrón I podría ser debida a productos tóxicos producidos por los macrófagos. El patrón III sería completamente diferente de los

anteriores, observándose una disfunción del oligodendrocito, que podría ser secundaria a una infección vírica o tóxica. El patrón IV sólo estaba presente en un grupo de pacientes con EMPP. El patrón IV comparte con el patrón I y II el crecimiento radial y alrededor de un vaso, y la pérdida simultánea de todas las proteínas de la mielina. Sin embargo, la gran pérdida de oligodendrocitos, la falta de remielinización y la presencia de oligodendrocitos en apoptosis, indica la existencia de una oligodendropatía acompañante al fenómeno inflamatorio.

Estos hallazgos apoyarían la idea de que en la EM coexisten diferentes mecanismos patogénicos bajo un mismo síndrome, hecho que podría tener importantes connotaciones patogénicas y terapéuticas.

2 - PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN LA PATOGENIA DE LA EM

2.1 - Generalidades

Las células inmunes se comunican vía directa por contacto célula-célula o por medio de moléculas solubles que incluyen la creciente familia de las citoquinas. Las citoquinas son polipéptidos que modulan las interacciones de célula a célula, y se unen a receptores específicos⁷². La mayoría de las citoquinas son extremadamente pleiotrópicas, es decir, son producidas por una variedad de tipos de células y actúan sobre diferentes células.

En relación a las citoquinas producidas por los linfocitos T colaboradores y su relación con la EM, intentamos simplificar las complicadas redes de interacción entre células y moléculas dividiéndolas en dos clases: células Th1 o proinflamatorias y células Th2 o antiinflamatorias. Las primeras incluyen el factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- α y TNF- β), la interleuquina 1 beta (IL-1 β), la interleuquina 2 (IL-2), el interferon gamma (IFN- γ), la interleuquina 12 (IL-12), la interleuquina 15 (IL-15) la interleuquina 18 (IL-18) y ciertas quimiocinas (citoquinas de pequeño peso molecular con propiedades quimiotácticas)⁷³⁻⁷⁷.

Las citoquinas anti-inflamatorias modulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B y contraregulan las células Th1, inhibiendo a los macrófagos y también la expresión del CMH. Incluyen el interferón alfa y beta (IFN α y IFN β), el factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), la interleuquina 4 (IL-4), la interleuquina 5 (IL-5), la interleuquina 6 (IL-6), la interleuquina 10 (IL-10) y la interleuquina 13 (IL-13)⁷⁸. Algunas citoquinas presentan actividad pro- y anti-inflamatoria. Por ejemplo la IL-6, la cual provoca la

estimulación de las células B y la inducción de la respuesta de la fase aguda⁷⁹, pero es asimismo probable que tenga una influencia más restringida en los procesos inflamatorios y desmielinizantes de la EM, induciendo la producción de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, enzimas producidas por macrófagos conocidos como potenciales destructores de la capa de mielina⁸⁰.

La mayoría de las citoquinas detectadas en las placas de EM se sabe que son producidas por macrófagos (IL-1, IL-6, FCT β , TNF α) y linfocitos (IL-2, IL-4, IFN γ , TNF α , TNF β , IL-6). De todos modos se han localizado IL-4, IFN- γ , y TNF- α en astrocitos, como resultado de una captación desde el espacio extracelular, o porque posiblemente las células tengan capacidad de síntesis. Las citoquinas que se asociaron más evidentemente con actividad desmielinizante fueron las IL-6, IL-4, IFN- γ , y TNF- α ⁷⁸.

Los efectos de las citoquinas también son dependientes del microambiente y no se ha descartado que citocinas antiinflamatorias puedan activar fenómenos inflamatorios en un contexto determinado. Para añadir complejidad, algunas citoquinas pueden actuar a distancia, de forma similar a algunas hormonas, mientras otras se comportan de la misma forma que los neuropéptidos transmisores.

Las citoquinas, a su vez activan moléculas de adhesión, que juegan un papel directo en la adhesión célula-célula. La adhesión es necesaria para permitir el paso de células al SNC⁸¹.

Nuestro grupo analizó la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en las distintas formas clínicas de EM⁸² y encontramos un porcentaje similar de células productoras de citoquinas entre los pacientes con EM en comparación a CS y no hallamos diferencias significativas entre las distintas formas clínicas de EM.

2.2 - OSTEOPONTINA

2.2.1 - Generalidades

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína fosforilada con una estructura homóloga a las proteínas de la matriz extracelular, y que puede unirse a un gran número de receptores, incluyendo integrinas, y CD44. La OPN se encuentra distribuida en diversos tejidos. Es abundante en la matriz ósea, y está presente en multitud de órganos como el riñón y el cerebro, así como en el tracto gastrointestinal, en el sistema vascular, en músculo liso, páncreas, pulmón, glándulas salivares y placenta. La OPN también se encuentra como citocina en fluidos corporales (sangre, orina, leche, líquido seminal...) ⁸³⁻⁸⁴.

La OPN está sintetizada por diferentes células no inmunes, como las células óseas (osteoblastos, osteoclastos), células epiteliales y células endoteliales.

A nivel del sistema inmune, existen diversas células inmunes que sintetizan la OPN como los macrófagos activados, las células T activadas y las células NK activadas. Además existe una gran variedad de mediadores inflamatorios y factores de crecimiento que estimulan la transcripción de OPN (a través de la activación de la proteína quinasa C) como el TNF- α , IL-1 β , IL-2, lipopolisacárido (LPS), 1-25-dihidroxi-colecalciferol, angiotensina II, concanavalina A (Con A) y adyuvante completo de Freund (CFA) entre otros.

La osteopontina coestimula la proliferación de células T y se clasifica como una citocina Th1 por su capacidad para aumentar la producción de IFN- γ e IL-12.

2.2.2 - FUNCIONES DE LA OSTEOPONTINA

A) Funciones no inmunes de la Osteopontina

La OPN es una proteína con diversas funciones⁸⁵. La OPN se encuentra en el tejido óseo, en condiciones normales y participa en la biomineralización, regulando el depósito de calcio y la actividad de los osteoclastos⁸⁶. También se asocia a la reparación de tejidos, fibrosis y calcificaciones distróficas tras lesiones inmunológicas⁸⁷.

En el riñón, la OPN se expresa, en condiciones fisiológicas, en nefronas y epitelio tubulointersticial. Se asocia a diferentes patologías, como glomerulonefritis, formación de cálculos, etc. También tiene un papel en la regeneración del tejido renal, por ejemplo tras la isquemia⁸⁸.

Otras funciones de la OPN son: participar en el crecimiento tumoral, en el desarrollo de cáncer y metástasis⁸⁹⁻⁹¹. Participa en la patogenia de la arteriosclerosis, estimulando la migración de células endoteliales.

La OPN interviene en la resolución de diversas infecciones. La OPN participa en el reclutamiento de macrófagos y linfocitos como respuesta a infecciones virales, por ejemplo VHS, y bacterianas, como la listeria monocytogenes.

La OPN también participa en la formación de granulomas celulares⁹². La respuesta granulomatosa característica de la sarcoidosis y de la tuberculosis se asocia a una elevada expresión de OPN.

B) Funciones inmunes de la Osteopontina

Las funciones inmunes de la OPN son diversas. La OPN es una citoquina proinflamatoria que participa en la activación temprana de linfocitos T. Por tanto, actúa en la iniciación de la respuesta inmune⁹³⁻⁹⁴.

- 1) Tiene una función quimiotáctica, de reclutamiento celular de linfocitos T y macrófagos⁹⁵⁻⁹⁶.
- 2) Produce un aumento en la expresión de citoquinas Th1 y una supresión de la producción de citoquinas Th2. La OPN induce directamente la producción de IL-12 por macrófagos e inhibe la expresión de IL-10 en macrófagos estimulados con LPS. También aumenta la producción de IFN- γ y aumenta la expresión de CD40L en linfocitos T, que a su vez aumenta la producción de IL-12 dependiente de células T por monocitos⁹⁷.
- 3) Induce la proliferación de células B y la producción de anticuerpos⁹⁸.
- 4) Produce un aumento de la supervivencia de las células inflamatorias⁹⁹.
- 5) En algunos trabajos, se ha descrito que la OPN podría tener una actividad antiinflamatoria, dado que inhibe la producción *in vitro* de óxido nítrico por macrófagos⁹⁹⁻¹⁰⁰.

2.2.3 - RELACIÓN DE LA OSTEOPONTINA CON LA PATOGENIA DE LA EM

La hipótesis que la OPN podría jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad surgió a partir de una publicación reciente donde se investigó la función de la OPN en la EM y en el modelo animal de EM, la encefalitis autoinmune experimental (EAE)¹⁰¹. En experimentos previos este grupo investigador analizó la expresión de genes que estaban aumentados en el SNC durante la fase activa de la EAE, y que volvían a su estado normal cuando se administraba a las ratas un inhibidor de las metaloproteasas de la matriz extracelular. Este estudio se realizó mediante la técnica de los "microarrays" y los genes estudiados fueron seleccionados por dicho grupo investigador. Estos estudios mostraron que la expresión de OPN estaba elevada en los cerebros de ratas con EAE pero no en los cerebros de ratas tratadas con el inhibidor de las metaloproteasas. En experimentos paralelos, se crearon dos librerías de ADN complementario a partir de muestras de cerebro de pacientes con EM. La librería MS1 se creó a partir de un paciente con EMCD que presentaba lesiones inflamatorias activas. La librería MS2 se formó a partir de un *pool* de tejido cerebral procedente de dos pacientes con EM, uno con lesiones activas y otro con lesiones crónicas. Cuando estas dos librerías se compararon con una librería control procedente de tejido cerebral de un paciente que falleció por fallo cardíaco (y que no presentaba alteraciones neuropatológicas) se observó expresión de OPN en las librerías procedentes de los pacientes con EM pero no en la librería control.

Se secuenciaron más de 11.000 clones de las librerías MS1 y MS2 y de la librería control, y el análisis se centró en los genes que estaban

presentes en las librerías MS1 y MS2, pero no en la librería control. Se seleccionaron 423 genes que incluían 26 genes que no se habían caracterizado previamente. De estos genes, 54 mostraron una expresión elevada (cambio medio igual o superior a 2.5 en las dos librerías). La OPN se encontraba entre los 6 transcritos más abundantes presentes de forma exclusiva en las librerías de pacientes con EM, junto con la alfa B-cristalina, la prostaglandina D-sintasa, la proteína transportadora prostática, y la proteína ribosomal L117. El siguiente paso fue estudiar la expresión de OPN mediante inmunohistoquímica en muestras de cerebro de pacientes con EM y de controles. Dentro de las placas activas de EM, la OPN se encontró expresada en las células endoteliales y en los macrófagos. Los astrocitos reactivos y la microglía también expresaron OPN. A continuación se estudió la función de la OPN en la enfermedad desmielinizante inflamatoria usando dos modelos de EAE. Primero se usó el modelo remitente-recurrente de EAE en ratones SJL inmunizados con el péptido 139-151 de la proteína proteolipídica (PLP 139-151). Se recogieron muestras de tejido cerebral y de médula espinal durante la fase aguda de la enfermedad, durante la remisión, y en la primera recidiva. Se encontró expresión de OPN en la microglía durante la recidiva y la remisión de la enfermedad, y se localizó cerca de las lesiones inflamatorias perivasculares. Las neuronas también mostraron expresión de OPN en la fase aguda de la enfermedad y en la recidiva, pero no durante la remisión. También se estudió la expresión de OPN en un modelo agudo y monofásico de EAE con ratas Lewis. Al igual que ocurría en el modelo remitente-recurrente de EAE, la expresión de OPN se observó en microglía y neuronas cerca de las lesiones agudas.

Estos resultados involucran la OPN en las formas agudas y recidivantes de EAE, y sugieren que el grado de expresión de osteopontina en las lesiones correlaciona con la severidad de la enfermedad.

La función de la OPN en la enfermedad desmielinizante se estudió también en ratones knock-out para la osteopontina (OPN^{-/-}). La EAE se indujo con el péptido 35-55 de la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG 35-55) en ratones knock-out para la OPN (OPN^{-/-}) y en ratones control (OPN^{+/+}). Aunque la EAE se observó en el 100% de los ratones de ambos grupos, en el grupo OPN^{-/-} los ratones presentaron una menor severidad de la enfermedad, y además no se observó ninguna muerte relacionada con la EAE en dicho grupo. Así pues, parece ser que la OPN ejerce una importante influencia en el curso de la EAE inducida por MOG 35-55. Cuando en estos ratones se estudió la tasa de recidivas y remisiones, los ratones OPN^{-/-} mostraron una evolución diferente presentando un mayor porcentaje de ratones en fase de remisión comparado con los controles. Cuando los ratones de ambos grupos se sacrificaron para realizar estudio histopatológico, se observó que el grado de inflamación del SNC fue similar en los dos grupos.

El siguiente paso fue estudiar la respuesta proliferativa de las células T de ratones OPN^{-/-} y OPN^{+/+} frente a la MOG 35-55. Las células T de ratones OPN^{-/-} mostraron una respuesta proliferativa frente al antígeno disminuida comparado con las células T de ratones OPN^{+/+}. Cuando se estudió la expresión de citoquinas se observó que la producción de IL-10 estaba aumentada y la de IFN- γ e IL-12 disminuida en los ratones OPN^{-/-} comparado con el grupo control OPN^{+/+}.

Puesto que el IFN- γ y la IL-12 son importantes citoquinas proinflamatorias en la EM, el hallazgo de una producción disminuida de estas citoquinas en los ratones OPN^{-/-} apoya la hipótesis de que la OPN juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune Th1 en la EM y en la EAE. Además, la IL-10 se ha asociado con remisión en la EAE, y en este contexto el aumento de la producción de IL-10 en los ratones OPN^{-/-} explicaría la tendencia de estos ratones a entrar en remisión.

Por tanto, parece evidente que la OPN, una citoquina proinflamatoria conocida desde hace años, parece jugar un papel importante en la enfermedad desmielinizante, tanto en el curso clínico de la EAE, como su influencia en enfermedades autoinmunes mediadas por células Th1 como es la EM.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS

Dado que la OPN es una citoquina proinflamatoria que participa en la inmunidad celular Th1, hipotetizamos que la OPN puede estar relacionada con la actividad de la enfermedad en la EM, tanto en la aparición de los brotes como en la progresión de la discapacidad.

OBJETIVOS

Determinar la producción de OPN en la EM.

1. Estudiar diferencias en los niveles plasmáticos de OPN en las diferentes formas clínicas de EM (EMRR/EMSP/EMPP).
2. Determinar los niveles plasmáticos de OPN durante el brote.
3. Estudiar la relación entre los niveles de OPN y actividad de la enfermedad (brotes, EDA).
1. Estudiar si los niveles de OPN predicen la evolución clínica y radiológica de los pacientes con EMPP/EMT.

Pacientes y Método

PACIENTES

I - Pacientes con EM y controles sanos

Se ha estudiado un total de 221 pacientes con esclerosis múltiple clínicamente definida (EMCD) y 36 controles sanos (CS). Todos los pacientes eran seguidos en la Unitat de Neuroimmunologia Clínica (UNIC) del Hospital Vall d'Hebron, de forma periódica, donde las visitas habituales se realizan cada 3 meses, y además se realizan visitas urgentes en caso de brotes.

Todos los pacientes tenían un periodo libre de tratamiento (incluido los corticoides) de 3 meses previos al estudio.

Este estudio ha sido aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Vall d'Hebron y todos los pacientes implicados han firmado un consentimiento informado.

II - La UNIC

La UNIC, en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, realiza una amplia actividad de investigación, docente y asistencial. En las consultas externas y hospital de día de la UNIC se realizan más de 5800 visitas anuales con un total de 2000 pacientes con EM en control periódico.

La investigación que se lleva a cabo en la UNIC depende de su propio laboratorio así como de colaboraciones con otros laboratorios nacionales e internacionales y de su propia actividad clínica, ya que dispone de un gran número de pacientes estudiados de forma exhaustiva y prospectiva desde el punto de vista clínico, todo ello recogido en diferentes bases de datos y en la propia historia.

MÉTODO

I - PROTOCOLO CLÍNICO

1 - Protocolo de recogida de datos

La información se obtuvo de un protocolo de recogida de datos que incluía los siguientes parámetros:

1) Características sociodemográficas:

- Fecha de nacimiento
- Sexo: Varón o mujer

2) Formas clínicas de EM.

La decisión de la forma clínica de cada paciente, se decide en las sesiones clínicas diarias realizadas en la UNIC, consensuando la opinión de todos los neurólogos expertos en EM.

- Esclerosis múltiple remitente-recurrente (EMRR), definida por la presencia de brotes de la enfermedad con recuperación completa o con secuelas, sin existir progresión de la enfermedad entre brotes.
- Esclerosis múltiple secundariamente progresiva (EMSP), caracterizada por tener un curso inicial RR seguido de progresión de la enfermedad con o sin brotes superimpuestos.
- Esclerosis múltiple primariamente progresiva (EMPP), definida por la progresión de la enfermedad desde el inicio, con estabilizaciones ocasionales pero sin brotes. Existe un subgrupo de pacientes, llamado transicional progresiva (EMTP) en los cuales, aunque el curso es progresivo desde el inicio, se ha registrado un único brote a lo largo de la evolución.

- Pacientes con EMRR en tratamiento con IFN beta (IFN beta 1b sc, IFN beta 1a IM ó IFN beta 1a sc). La muestra de sangre fue extraída en el mes 9 de tratamiento.

Se definió brote como la presencia de un síntoma neurológico nuevo o un aumento de los síntomas neurológicos previos que dura más de 24 horas en ausencia de fiebre o infección.

- 3) La escala de discapacidad que utilizamos en el estudio fue la escala de Estado de Discapacidad Ampliada (EDA) y la puntuación de Síntomas Funcionales (SF) desarrollados por Kurtzke³. La descripción de los sistemas funcionales y de la escala de EDA ya se ha explicado en la introducción. La puntuación de dicha escala queda determinada mediante examen clínico, excepto para la determinación de la función de la vejiga urinaria y del intestino, que se realiza basándose en elementos subjetivos de la historia. La EDA es una escala ordinal con incrementos de 0,5 puntos que oscila entre 0 (examen normal) y 10 (muerte por EM).

Se recogió la EDA 2 años antes, EDA 1 año antes, EDA en el momento de extraer la muestra sanguínea, EDA en la visita siguiente y EDA 1 año tras la extracción de la muestra.

- 4) Se recogió el número de brotes en los 2 años previos, en el año previo y un año tras la extracción de la muestra. Se calculó la tasa de brotes en los 2 últimos años (número de brotes en los 2 años previos/2), en el último año, así como en el año posterior a la recogida de la muestra.

- 5) Características del inicio de la enfermedad. Se registró la edad de inicio de la enfermedad y el tiempo de evolución de la EM.
- 6) Características de la progresión. Se recogió la edad al inicio de la progresión y se calculó la tasa de progresión global (EDA en el momento de extracción de la muestra / años de progresión), así como el incremento en la EDA en los 2 años previos y en el año previo.
- 7) En el subgrupo de pacientes con EMPP/EMTP se realizó una RM craneal. Este subgrupo de pacientes fue incluido en un ensayo clínico fase II que estudiaba la seguridad del interferón beta versus placebo. A todos ellos se les practicó un estudio de neuroimagen evaluada por un neuroradiólogo ciego para los resultados clínicos.
- 8) Se recogió el tratamiento previo realizado: no tratamiento / Interferón beta / Mitoxantrona / Corticoides / Otros

Con la recogida de estas variables, se ha podido estudiar el papel de la OPN en diferentes aspectos de la EM:

1.- Niveles plasmáticos de OPN y curso clínico de la EM.

Para investigar si la producción de OPN es diferente en las distintas formas clínicas de EM, se determinaron los niveles plasmáticos de OPN en distintas formas clínicas (n= 71 EMPP/EMPT; n= 35 EMSP; n=46 EMRR).

2.- Niveles plasmáticos de OPN y brotes en la EMRR.

Para estudiar si la producción de OPN en pacientes con EMRR se modifica durante el brote, se determinaron los niveles de OPN en plasma en pacientes durante la remisión clínica (n=46) y durante el brote (n=26).

3.- Niveles de OPN en plasma y progresión de la discapacidad.

Para investigar el papel de la OPN en la actividad de la enfermedad crónica, se estudiaron pacientes con EMSP y se clasificaron en función del empeoramiento de la discapacidad en el año previo.

La discapacidad fue medida en el momento de extracción sanguínea, un año antes y al menos 3 meses después de la extracción, mediante la escala de discapacidad de EDA.

El empeoramiento de la discapacidad fue definida como un incremento en la escala de EDA de al menos 1 punto (si EDA inicial \leq 5,0) o de 0,5 puntos (si EDA inicial $>$ 5.0) y confirmado a los 3 meses. Se excluyeron los pacientes con EMRR durante el brote, dado que el cambio en la escala de EDA se relacionaba con la exacerbación clínica pero no con la discapacidad crónica.

4.- Modificación de la producción de OPN durante el tratamiento con Interferón (IFN) beta.

El IFN beta reduce la razón de brotes y la actividad de la enfermedad por RM en pacientes con EMRR.

Para investigar el efecto del IFN beta en los niveles de OPN en plasma se estudió un grupo adicional de 43 pacientes con EMRR en tratamiento con IFN beta (30 avonex, 5 betaferon y 8 rebif). Para minimizar la variabilidad en los efectos del INF beta y homogeneizar los grupos se escogieron pacientes en el mes 9 de tratamiento con IFN beta.

5.- Relación entre la actividad de la enfermedad medida mediante la RM craneal, y los niveles plasmáticos de OPN.

Para ellos se estudió un subgrupo de pacientes con EMPP/EMTP que participaron en un ensayo clínico, y en los que se realizó un estudio seriado de neuroimagen.

II - PROTOCOLO INMUNOLÓGICO

1 - Recogida de muestras

La sangre periférica fue recogida mediante venopunción estándar, de 40 ml de sangre periférica, en tubos con EDTA. El plasma fue aislado mediante centrifugación y almacenado en el congelador a -80°C hasta su uso.

Nuestra intención era utilizar dichas muestras para el estudio actual. Para ello se obtuvo el consentimiento informado, por escrito, para la utilización de las muestras específicamente para este proyecto, a la vez que solicitamos la autorización para conservar el volumen sobrante para futuros estudios. Los investigadores se comprometieron a no utilizar ni conservar las muestras de ninguna persona que exprese su negativa a que ello se lleve a cabo.

2 - ELISA

Los niveles plasmáticos de OPN en los diferentes grupos de estudio, fueron cuantificados mediante enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) utilizando un kit comercial (Osteopontin TiterZyme® Enzyme Immunometric Assay, Asay Designs Inc., Ann Arbor, U.S.A.).

En resumen, la OPN recombinante humana y las muestras de plasma, de los pacientes y controles sanos, diluidas a 1:10 se añadieron en placas de 96 pocillos sembradas previamente con un anticuerpo policlonal reactivo contra la OPN, y se incubaron durante 1 hora a 37°C . Se realizó un lavado de la placa para eliminar el exceso de anticuerpos, la placa se incubó durante 30 minutos a 4°C con un

anticuerpo monoclonal contra la OPN conjugado con el enzima peroxidasa. Tras 9 lavados se añadió un buffer con cromógeno y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente se añadió ácido sulfúrico 1N para terminar la reacción y se obtuvieron las absorvancias en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

El rango de concentración de OPN en la curva estándar fue de 160 ng/ml a 5 ng/ml. La técnica tiene un límite inferior de detección de 2.2 ng/ml. La concentración de OPN en nuestras muestras se calculó a partir de una curva logística de 4 parámetros obtenida con las muestras estándar.

La variabilidad intra-ensayo de la ELISA era de 6.1% y la variabilidad inter-ensayo era de 13.4%. Las muestras de plasma eran etiquetadas con un código y el experimento se realizó con un método ciego a los resultados clínicos del paciente.

III - PROTOCOLO DE RM

Se realizó un estudio de neuroimagen mediante la práctica de una RM craneal a todos los pacientes con una forma EMPP/EMTP. Las exploraciones fueron evaluadas por un neuroradiólogo ciego para los resultados clínicos.

Se realizó una RM craneal en equipos superconductivos de 1.5 ó 1.0 teslas. Para el estudio craneal se realizaron secuencias potenciadas en T2 en plano transversal con un grosor de corte de 5 mm y una distancia entre cortes de 1.5 mm; secuencias potenciadas en T1 y estudio de lesiones activas (lesiones nuevas o lesiones aumentadas de tamaño respecto controles previos).

IV - ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el SPSS 11.0 package (SPSS Inc, Chicago, IL) de MS-Windows. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para comparar los niveles plasmáticos de OPN entre las diferentes formas clínicas de EM.

Se realizó una corrección de Bonferroni para corregir el nivel alfa (inicialmente fijado al valor de 0.05) para múltiples comparaciones. La asociación lineal entre los niveles de OPN en plasma y las variables clínicas fueron evaluadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson o rango de Spearman, en función de la aplicabilidad de las condiciones.

Los datos descriptivos son presentados mediante valores de media y su desviación estándar (DE).

Resultados

I - CARACTERÍSTICAS BASALES

Formas clínicas de EM

Se ha estudiado un total de 221 pacientes con EM así como 36 controles sanos (CS).

La clasificación según la forma clínica de EM es la siguiente:

- EMRR = 115 (52%)
 - EMRR en remisión = 46 (20,8%)
 - EMRR durante el brote = 26 (11,7%)
 - EMRR en tratamiento con IFN beta = 43 (19,5%)
- EMSP = 35 (15,9%)
- EMPP/EMT = 71 (32,1%)

Sexo

Existe una predilección por el sexo femenino en todas las formas de EM, excepto en los pacientes con EMPP/EMT que muestran una misma frecuencia entre géneros.

Porcentaje de mujeres: 63% en EMRR en remisión, 69,2% en EMRR durante el brote, 67,4% en EMRR en tratamiento con IFN-beta, 80% en pacientes con EMSP y 50,7% en pacientes con EMPP/EMTP.

(Tabla 5)

Edad en el momento del estudio

La edad en el momento de la extracción de la muestra de plasma para la determinación de los niveles de OPN era superior en las formas EMPP/EMTP y EMSP que en las formas EMRR.

La edad media en el momento del estudio fue de 49,2 años (DE 8,2) para las formas EMPP/EMTP; 47,5 años (DE 9,5) para la EMSP; 35,6 años (DE 8,8) para las formas EMRR en remisión; 34,7 años (DE 9,1) para los pacientes con EMRR en tratamiento con IFN-beta y 30,7 años (DE 9,9) para los pacientes en brote.

(Tabla 5)

Existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre las formas progresivas (EMPP/EMTP y EMSP) y la forma EMRR.

Edad al inicio de la enfermedad

Los pacientes con EMPP/EMT tienen una edad al inicio de la enfermedad mayor ($37,9 \pm 9,3$) que los pacientes con EMRR ($28,8 \pm 8,8$) y EMSP ($27,6 \pm 7,7$).

(Tabla 5)

Existen diferencias estadísticamente significativas en la edad de inicio de la enfermedad entre la forma clínica EMPP/EMTP y las formas EMRR y EMSP ($p < 0,0001$).

Edad al inicio de la progresión de la enfermedad

La edad al inicio de la progresión de la discapacidad es ligeramente superior en los pacientes con EMSP ($41,6 \pm 9$) que en las formas EMPP/EMT ($38,9 \pm 9,2$) con unas diferencias que no llegaron a alcanzar la significación estadística ($p=0,16$).

(Tabla 5)

Tiempo de evolución de la enfermedad

El tiempo de evolución desde el inicio de los síntomas de la enfermedad es superior en los pacientes con EMSP ($23,8 \pm 10,2$) que en los pacientes con EMPP/EMT ($15 \pm 6,6$) y EMRR ($11,8 \pm 6$).

(Tabla 5)

Existen diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de evolución de la enfermedad entre la forma clínica EMSP y las formas EMPP/TP y EMRR ($p<0,0001$).

Tiempo de progresión de la discapacidad

Los pacientes con EMPP/EMT llevan más tiempo de progresión de la discapacidad ($10,3 \pm 6,1$) que los pacientes con EMSP ($5,9 \pm 6,3$), con unas diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p=0,001$).

(Tabla 5)

TABLA 5. Características socio-demográficas.

	EMRR remisión en brote IFN-beta			EMSP	EMPP/EMTP
N (%)	46 (20,8%)	26 (11,7%)	43 (19,5%)	35 (15,9%)	71 (32,1%)
Mujer/Hombre (% mujer)	29/17 (63%)	18/8 (69,2%)	29/14 (67,4%)	28/7 (80%)	36/35 (50,7%)
Edad actual (años)	35,6 (8,8)	30,7 (9,9)	34,7 (9,1)	47,5 (9,5)	49,2 (8,2)
Edad inicio EM (años)	28,8 (8,8)	24,4 (6,9)	26,2 (8,5)	27,6 (7,7)	37,9 (9,3)
Edad inicio de la progresión (años)	--	--	--	41,6 (9,0)	38,9 (9,2)
Duración de la EM (años)	11,8 (6,0)	10,9 (7,3)	12,2 (6,2)	23,8 (10,2)	15,0 (6,6)
Duración de la progresión (años)	--	--	--	5,9 (6,3)	10,3 (6,1)

EMRR : esclerosis múltiple remitente recurrente

EMSP: esclerosis múltiple secundariamente progresiva

EMPP/EMTP: esclerosis múltiple primariamente progresiva/ transicional progresiva

La edad se expresa en media (Desviación Estandar)

La edad actual hace referencia a la edad en el momento de extracción de la muestra para el estudio.

EDA en el momento de la extracción

La discapacidad medida por la EDA en el momento de la extracción de la OPN fue superior en los pacientes con EMSP (media $5.8 \pm 1,2$; mediana 6.0 y rango 4-9), seguido de los pacientes con EMPP/EMT (media $5.2 \pm 1,3$; mediana 6.0 y rango 2-8), EMRR durante el brote (media $3.2 \pm 1,1$; mediana 3.0 y rango 2-6.5); EMRR en remisión (media $2,5 \pm 1,3$; mediana 2.5 y rango 1-5.5) y EMRR en tratamiento con IFN-beta (media $2 \pm 1,1$; mediana 2.0 y rango 0-5.5). (Tabla 6)

EDA en el año previo

La EDA medida en el año previo a la extracción de la OPN fue de 5.5 (rango 3-8.5) para la forma EMSP; 5.0 (rango 2-7) para la EMPP/EMTP; 2.0 (rango 0-5.5) para la EMRR en remisión; 2.0 (rango 0-3.5) para los pacientes con EMRR en tratamiento con IFN-beta y 1.5 (rango 0-6) para los pacientes en brote. (Tabla 6).

Incremento de EDA en el año previo

El incremento de EDA en el año previo al estudio fue de 0,48 (DE 0,4) para las formas EMSP y de 0,28 (DE 0,8) para las formas EMPP/EMTP. (Tabla 6).

Tasa de progresión

La tasa de progresión es la EDA en el momento de extracción de la muestra de OPN dividido por los años de progresión. La tasa de progresión es superior en las formas EMSP (2,45) que en las formas EMPP/EMTP (0,72).

(Tabla 6)

Número de brotes en el año previo

El número de brotes en el año previo al estudio fue mayor en el grupo de pacientes con EMRR en remisión ($1,4 \pm 0,7$), seguido de EMRR en brote ($1,3 \pm 0,9$), EMRR durante el tratamiento con IFN ($1,2 \pm 0,7$) y EMSP ($0,6 \pm 0,6$).

(Tabla 6).

TABLA 6. Actividad de la enfermedad.

	EMRR			EMSP	EMPP/EMTP
	En remisión	en brote	IFN-beta		
EDA actual	2.5 (1-5.5)	3.0 (2-6.5)	2.0 (0-5.5)	6.0 (4-9)	6.0 (2-8)
EDA 1 año previo	2.0 (0-5.5)	1.5 (0-6)	2.0 (0-3.5)	5.5 (3-8.5)	5.0 (2-7)
Incremento EDA en el año previo (media)	--	--	--	0,48 (0,4)	0,28 (0,8)
Tasa de progresión	--	--	--	2,45 (2,3)	0,72 (0,6)
Nº brotes en el año previo	1,4 (0-3)	1,3 (0-4)	1,2 (0-3)	0,6 (0-2)	0,1 (0-1)

EMRR : esclerosis múltiple remitente recurrente

EMSP: esclerosis múltiple secundariamente progresiva

EMPP/EMTP: esclerosis múltiple primariamente progresiva/ transicional progresiva

EDA = escala de Estado de Discapacidad Ampliada. La EDA se expresa en mediana (rango).

Progresión en el año previo: se tiene en cuenta el incremento de 1 punto en la escala de EDA (si EDA inferior o igual a 5.0) o incremento de 0.5 puntos en la escala de EDA (si EDA superior a 5.0).

Tasa de progresión: EDA en el momento de extracción de la OPN/años de progresión.

Niveles plasmáticos de OPN

Se registraron distintos niveles plasmáticos de OPN (ng/ml) en función de la forma clínica de EM:

- EMRR en remisión: $618,9 \pm 247$
- EMRR durante el brote: $808,7 \pm 276,1$
- EMRR en tratamiento con IFN-beta: $684,1 \pm 160,5$
- EMSP: $863,9 \pm 254,9$
- EMPP/EMT: $633,5 \pm 193,3$
- Controles sanos: $660,6 \pm 232,5$

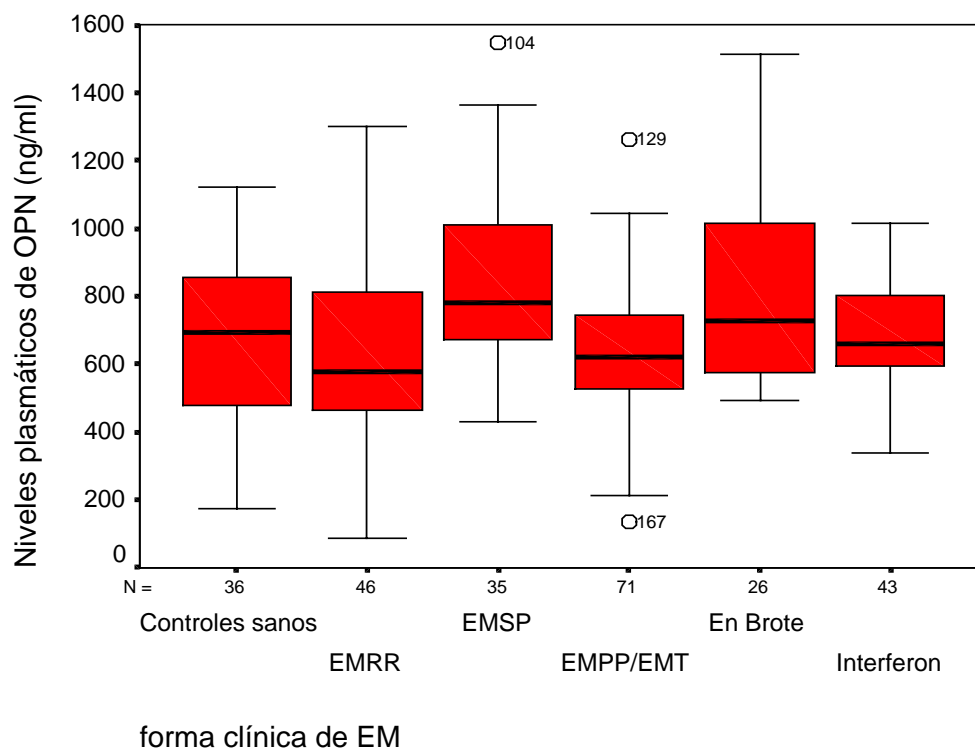
Existen diferencias entre los niveles plasmáticos de OPN en las distintas formas clínicas de EM. Existe una producción mayor de OPN en las formas EMSP, seguidas de la EMRR durante el brote.

(Figura 1)

Niveles plasmáticos OPN (ng/ml)

CS	660,6 (DE 232,5)
EMRR en remisión	618,9 (DE 247)
EMSP	863,9 (DE 254,9)
EMPP/EMTP	633,5 (DE 193,3)
EMRR en brote	808,7 (DE 276,1)
EMRR con IFN-beta	684,1 (DE 160,5)

Figura 1. Niveles plasmáticos de OPN (ng/ml) en las distintas formas clínicas de EM.



II - RESULTADOS INMUNOLÓGICOS

Con todos estos resultados podemos clasificar los resultados del estudio en los siguientes apartados:

1 - Los niveles de OPN en plasma están aumentados en pacientes con EMSP

Nosotros investigamos los niveles de OPN en plasma de pacientes con distintas formas clínicas de EM y CS, y pudimos observar que los pacientes con EMSP tenían unos niveles más altos de OPN en plasma.

Los niveles de OPN es plasma fueron de 660,6 ng/ml (DE 232,5) en CS; 618,9 ng/ml (DE 247,0) en pacientes con EMRR durante la remisión clínica; 863,9 ng/ml (DE 254,9) en pacientes con EMSP y 633,5 ng/ml (DE 193,3) en pacientes con EMPP/EMTP.

Los niveles plasmáticos de OPN eran más elevados, de una forma estadísticamente significativa, en pacientes con EMSP en comparación a CS ($p=0,001$), EMRR en remisión ($p=0,0001$) y EMPP/EMTP ($p=0,0001$).

2 - Aumento en la expresión de OPN en pacientes con EMSP que cursa a brotes

Analizamos aquellos pacientes con EMSP que presentaban brotes intercalados con la progresión de la discapacidad. Encontramos que 19 pacientes tenían brotes y 16 pacientes con EMSP progresaban sin brotes.

Los niveles plasmáticos de OPN fueron más elevados en el grupo con EMSP que presentaba brotes (892,9 ng/ml \pm 283,9) que aquellos pacientes sin brotes (829,5 ng/ml \pm 219,5) aunque la diferencia no era estadísticamente significativa ($p=0,4$).

3 - Los niveles de OPN en plasma están aumentados en pacientes con EMRR y EMSP sin progresión clínica.

Para poder investigar el papel de la OPN en la actividad de la enfermedad crónica, los pacientes con EM fueron clasificados en función de la progresión de la discapacidad. Se consideró progresión de la discapacidad en el año previo a la extracción de la OPN, si existía un aumento de 1 punto en la escala de EDA en aquellos enfermos con una EDA inferior o igual a 5.0; o bien un incremento de 0,5 puntos en la escala de EDA si los pacientes tenían una EDA superior a 5.0. Además, este incremento en la discapacidad se tenía que evaluar en el momento de extracción de la OPN y confirmarse en la visita posterior de 3 meses.

Las características basales de los pacientes con EMRR, EMSP y EMPP/EMTP en función de la existencia o no de progresión de la discapacidad en el año previo, eran similares. (Tabla 7).

TABLA 7. Comparación EMRR / EMSP /EMPP en función de la progresión de la discapacidad.

	EMRR		EMSP		EMPP/EMTP	
	Progresión	No progresión	Progresión	No progresión	Progresión	No progresión
N	8	36	18	17	22	49
Mujer/Hombre (% mujer)	4/4 (50%)	24/12 (66,7%)	15/3 (83,3%)	13/4 (76,5%)	11/11(50%)	25/24 (51,1%)
Edad actual (años)	36,8 (11,1)	35,5 (8,6)	47,4 (8)	47,6 (11,1)	47,1 (8,3)	50,2 (8,1)
Edad inicio EM (años)	30,1 (7,5)	28,6 (9,2)	26,6 (7,1)	28,7 (8,4)	38,4 (9,1)	37,7 (9,5)
Edad inicio de la Progresión (años)	-	-	41,7 (8,3)	41,6 (9,9)	38,9 (8,8)	39,0 (9,4)
Duración de la EM (años)	10,9 (7,1)	12,2 (5,9)	25,2 (10,5)	22,3 (9,8)	12,5 (4,1)	16,1 (7,1)
Duración de la progresión (años)	-	-	5,7 (7,6)	6,0 (4,8)	8,2 (4,3)	11,2 (6,5)
EDA actual	3,0 (1–5,5)	2,0 (1–5,5)	6,0 (4–9)	6,0 (4–8,5)	6,0 (3,5–8)	4,5 (2–7)
Incremento EDA año previo	1,4 (0,6)	0,9 (0,7)	0,75 (0,2)	0,2 (0,3)	0,91 (0,5)	0,12 (0,3)
Número brotes en el año previo	1,1 (0,6)	1,4 (0,6)	0,6 (0,6)	0,5 (0,5)	-	-

La edad, duración de la enfermedad, incremento EDA y número de brotes se expresa en media (DE). La EDA se expresa en mediana (rango)

Discusión

1 - Papel de la OPN en la patogenia de la EAE y la EM

Nuestros resultados apoyan un papel importante de la OPN en la actividad crónica de la enfermedad. Cuando se comparan los niveles de OPN en plasma entre las diferentes formas clínicas de EM, se observa que los pacientes con EMSP tienen niveles de OPN más elevados que los pacientes con EMRR en remisión, EMPP/EMTP y CS.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio no difieren de los estudios recientes que han mostrado que la OPN puede jugar un papel importante en la patogénesis de la EAE y de la EM, especialmente en la progresión de la enfermedad. El estudio de Chabas y cols¹⁰¹ apoya la idea de que la OPN tiene funciones variadas en la patogenia de la enfermedad desmielinizante. La producción de OPN por las células gliales puede contribuir al reclutamiento de las células Th1, y su presencia en células gliales y endoteliales puede ayudar a las células T inflamatorias a penetrar en el cerebro. Finalmente, estos resultados sugieren que las neuronas pueden secretar también esta molécula proinflamatoria y participar en el proceso autoinmune. La secreción neuronal de OPN podría modular la inflamación y desmielinización e influenciar la severidad clínica de la enfermedad.

El CD44 es un ligando conocido de la OPN que media la disminución en la producción de IL-10. Los ratones OPN^{-/-} presentaron una producción elevada de IL-10 durante el curso de la EAE, y además se ha demostrado que los anticuerpos contra CD44 previenen el desarrollo de la EAE. Estos hallazgos sugieren que el efecto inflamatorio de la OPN en la EAE y la EM podría estar mediado por el CD44. La unión de la OPN al receptor fibronectina-integrina $\alpha_v\beta_3$ a través del motivo tripeptídico arginina-glicina-aspartato podría

perpetuar también la inflamación Th1. En las lesiones activas de EM, la subunidad α_v de este receptor está expresada en exceso en macrófagos y células endoteliales, y la subunidad β_3 está expresada en las células endoteliales. A través de este motivo tripeptídico la OPN inhibe la sintetasa inducible del óxido nítrico. Así pues, como conclusión, la OPN ejerce su acción a diferentes niveles permitiendo diversas actividades en el curso de la desmielinización autoinmune.

En el modelo EAE, los ratones deficientes en OPN mostraban remisiones frecuentes¹⁰¹⁻¹⁰², y en pacientes con EM algunos polimorfismos del gen de la OPN podían conferir un incremento del riesgo de desarrollar un curso clínico secundariamente progresivo¹⁰³. Los resultados de los experimentos de este artículo parecen bastante claros en lo que se refiere a la influencia que la OPN tiene en el curso clínico de la EAE, y además, por sus funciones en la producción de IFN- γ e IL-12, la OPN encaja bastante bien en una enfermedad autoinmune mediada por células Th1 como es la EM.

2 - Papel de la OPN en la EMSP

En nuestro estudio, los pacientes con EMSP presentaron unos niveles plasmáticos de OPN elevados de forma estadísticamente significativa comparado con pacientes con EMRR en remisión y EMPP/EMTP.

La EMSP se considera la evolución natural de la EMRR y la mayoría de estos pacientes entrarán en esta fase⁴. La transición de la forma EMRR o EMSP está mal definida clínicamente y realizar el diagnóstico al inicio de la fase progresiva es dificultoso¹⁰⁴. En nuestro estudio, un error en la clasificación clínica entre pacientes con EMRR y EMSP es improbable, puesto que el grupo de pacientes con EMSP tiene una duración media de la fase progresiva de 6 años. En los pacientes con EMRR el elemento clave en la desmielinización es el proceso inflamatorio, mientras que en los pacientes con EMSP el daño axonal juega un papel importante en el desarrollo del daño irreversible¹⁰⁵.

Algunas citoquinas, como la IL-10 y la IL-12 están involucradas en las formas progresivas de la EM, en este sentido, algunos artículos han evidenciado un incremento en la producción de IL-12 en pacientes con EM progresiva crónica comparado con CS y pacientes con EMRR no tratados¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Aunque en estos estudios, tanto los pacientes con EMSP como con EMPP se incluían como progresivos crónicos, existen algunas evidencias que apuntan a un aumento en la expresión de IL-12 en pacientes con EMSP comparado con la forma EMPP¹⁰⁹. Por otro lado, también se ha encontrado una expresión baja de IL-10 en pacientes con EMSP comparado con pacientes con EMRR¹¹⁰. Puesto que la OPN influye en la producción de IL-12 y IL-10, estos hallazgos son congruentes con un incremento en la producción de OPN por células inmunes en pacientes con EMSP.

3 - Diferencias en la expresión de OPN entre EMSP y EMPP/EMTP

En base a nuestros resultados, es improbable que la OPN esté implicada en la patogénesis de la EMPP, y los mecanismos moleculares subyacentes de la progresión en pacientes con EMSP son probablemente diferentes que los implicados en la EMPP, dado que los niveles de OPN en la EMPP no difiere de los niveles en CS.

Desde el punto de vista clínico y radiológico, los pacientes con EMPP tiene menos lesiones captantes de gadolinio en la RM cerebral y responden peor al tratamiento anti-inflamatorio¹¹¹. Fisiopatológicamente, los pacientes con EMPP tienen menos revestimiento perivascular y menor infiltrado celular comparado con los pacientes con EMSP¹¹².

Se ha sugerido un perfil inmunológico diferente en los pacientes con EMPP comparado con los pacientes con EMRR y EMSP¹¹³⁻¹¹⁵. Sin embargo hay algunos resultados contradictorios, donde los pacientes con EMPP muestran un patrón de expresión de citoquinas y de moléculas de adhesión que en algunos aspectos es parecido a los CS^{113,116}.

Los pacientes con EMPP sufren un empeoramiento de su estado neurológico con un menor número y tamaño de lesiones, evidenciadas por RM, que aquéllas formas que cursan a brotes, lo que sugiere que su componente inflamatorio es mucho menor. Además, presentan diferencias en el perfil de moléculas de adhesión y citoquinas respecto a las formas EMRR y EMSP, apoyando que los mecanismos patogénicos de la EMPP son diferentes.

Las diferencias en los niveles plasmáticos de OPN entre pacientes con EMSP y EMPP/EMTP contribuyen a la heterogeneidad clínica, radiológica, e inmunológica encontrada en estos grupos.

A nivel patogénico, también existen datos que apoyan que el componente inflamatorio es menor en la EMPP¹¹⁷. Existen pocos datos a nivel inmunológico sobre la forma clínica EMPP. Se ha observado una frecuencia menor de bandas oligoclonales en el LCR de estos pacientes¹¹⁸, así como un incremento de anticuerpos anti-gangliósido¹¹⁹⁻¹²⁰, o de formas solubles de algunas moléculas de adhesión¹²¹⁻¹²². En este sentido, un estudio realizado por nuestro grupo ha mostrado que la forma EMPP difiere claramente de las formas que cursan en brotes en la expresión en membrana y formas solubles de moléculas de adhesión. Hemos encontrado una disminución de la expresión en membrana de LFA-1, ICAM-1, L-selectina y VLA-4 con aumento de formas solubles en suero (L-selectina, ICAM-1) en las formas de EM que cursan en brotes (EMRR y EMSP), lo que sugiere que en la EMPP hay una menor activación linfocitaria y menor inflamación¹¹³.

Por otra parte, se ha descrito que el LCR de pacientes con EMPP contiene factores solubles que inducen apoptosis de neuronas en cultivo¹²³, lo que sugiere que tal vez otros mecanismos, menos relacionados con la inflamación y más con lesión axonal, podrían estar implicados en la patogenia de la EMPP.

4 - papel de la OPN en la progresión de la enfermedad

Para investigar el posible papel de la OPN en la progresión de la enfermedad, los pacientes con EM se clasificaron en función de la progresión de la discapacidad neurológica. Para confirmar la progresión y poder hablar de progresión confirmada a los 6 meses¹²⁴ se tuvo en cuenta la evaluación de la EDA en el momento de extracción de la muestra para la OPN y a los 3 meses de la extracción.

Sorprendentemente, observamos que los pacientes con EMSP y EMRR sin progresión de la discapacidad en el año previo, tenían unos niveles plasmáticos de OPN significativamente más elevados en comparación a los pacientes con una progresión de la discapacidad confirmada. Las características clínicas de ambos grupos eran comparables. En cambio, los niveles de OPN en pacientes con formas EMPP eran similar independientemente de la actividad de la enfermedad. Este hallazgo refuerza la hipótesis anterior de la existencia de diferentes mecanismos de acción en la progresión de la enfermedad en pacientes con EMSP comparado con pacientes con EMPP/EMTP.

La observación que los niveles de OPN eran elevados en pacientes con EMSP y EMRR durante el brote, podría aparentemente estar en desacuerdo con los hallazgos del incremento de los niveles de OPN en pacientes con EMRR y EMSP sin progresión clínica. Sin embargo, además del papel de la OPN como citoquina proinflamatoria en la inmunidad mediada por células, la OPN es una proteína de la matriz extracelular con propiedades que pueden ser beneficiosas en la patogénesis de la EM. En este sentido, la expresión de OPN está aumentada tras varios tipos de daño tisular y es una de las más

abundantes secretoras de productos de activación de macrófagos durante la reparación del daño tisular, así sugiere un papel de la OPN en promover la recuperación.

El prototipo de daño tisular asociado a un aumento en la expresión de la OPN son heridas cutáneas⁹⁶, infarto de miocardio¹²⁵, fibrosis tubulointersticial renal¹²⁶ y formación de cálculos renales¹²⁷. En el SNC se ha descrito un aumento en la expresión de la OPN tras infartos focales en ratones sugiriendo un papel en la inducción de gliosis como parte de la reparación de tejidos¹²⁸.

La OPN tiene también unas propiedades anti-inflamatorias inhibiendo mediante su unión a integrinas la expresión de óxido nítrico sintasa inducible y la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos¹²⁹. Finalmente, la OPN ha mostrado jugar un papel como factor de supervivencia celular inhibiendo la apoptosis de células endoteliales¹³⁰, células tubulointersticiales renales¹²⁵ y células pro-B¹³¹.

A pesar de que es difícil extrapolar los cambios observados en sangre periférica con cambios en el SNC, es tentador especular que la elevada producción de OPN por los infiltrados de macrófagos puede actuar como un inhibidor de la inflamación y/o degeneración que tiene lugar en el SNC, como resultado de un efecto supresor en la producción de NO. El NO es potencialmente neurotóxico ya que contribuye al daño neuronal inducido por aminoácidos excitatorios y puede estar también involucrado en la muerte de oligodendrocitos¹³²⁻¹³³.

La OPN puede actuar como una molécula de la matriz extracelular en el SNC y facilitar la atracción celular y consecuente supervivencia celular. Es bien conocido que para la supervivencia celular, se requieren señales que faciliten la adhesión de células a la matriz extracelular¹³⁴⁻¹³⁶.

Finalmente, dadas las propiedades quimiotácticas de la OPN para los monocitos/macrófagos, una elevada producción de OPN puede facilitar el reclutamiento de monocitos de los vasos sanguíneos al interior del SNC. Como ha sido sugerido por algunos autores¹³⁷⁻¹³⁸, el infiltrado de células inmunes encontrado en las lesiones inflamatorias del SNC puede tener más bien un papel protector que destructor. Los macrófagos sustraen los restos de mielina favoreciendo el proceso de remielinización, y son también una fuente de algunos de los factores de crecimiento que están implicados en la remielinización.

5 - Expresión de OPN durante el brote

Los niveles de OPN en plasma en pacientes con EMRR durante el brote son similares a los encontrados en pacientes con EMSP y significativamente más elevados que en pacientes con EMRR durante la remisión clínica. Uno de los factores claves durante la exacerbación clínica que dirige las lesiones inflamatorias agudas del SNC es una disregulación aguda en el balance entre citoquinas pro- y antiinflamatorias¹³⁹.

Se ha evidenciado que, durante o precediendo la exacerbación clínica, existe un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias tipo TNF- α , IL-2 y IFN- γ y una disminución en la expresión de citoquinas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-10 en sangre periférica y LCR de los pacientes con EM^{110,140-143}. Además, clones específicos de células T para la PLP y la PMB en pacientes con EM durante el brote, producen un aumento de citoquinas proinflamatorias¹⁴⁴⁻¹⁴⁵.

Respecto a esto, se puede hipotetizar que la producción de OPN puede ser incrementada por citoquinas proinflamatorias. El hecho de encontrar que los niveles de OPN en los pacientes con EMRR durante el brote están más elevados que en los pacientes con EMRR en remisión, puede indicar que la OPN juega un papel en la actividad de la enfermedad aguda. No obstante, son necesarios estudios longitudinales que midan los niveles plasmáticos de OPN en diferentes tiempos durante el brote antes de etiquetar a la OPN como un marcador de la actividad de la enfermedad aguda en pacientes con EM.

6 - Expresión de OPN y tratamiento con IFN-beta

El IFN- β es el tratamiento más común de los pacientes con EMRR y ha mostrado que disminuye la frecuencia de brotes, reduce la actividad de la enfermedad medido con la RM cerebral y enlentece la progresión de la discapacidad¹⁴⁶.

Los niveles de OPN en plasma son similares en los pacientes con EMRR tratados con IFN- β de aquellos no tratados, lo cual sugiere que el efecto beneficioso del IFN- β , reduciendo la actividad inflamatoria no está mediada a través de cambios en la producción de OPN. Así, la OPN juega un papel más importante en la fase progresiva de la enfermedad, donde la eficacia del IFN- β no está bien establecida¹⁴⁷. Sin embargo, la producción de OPN no se ha determinado en pacientes con EMSP tratados con INF- β .

7 - Actividad en la resonancia magnética y niveles de OPN

A lo largo de los últimos años se han hecho diversos intentos por relacionar la desmielinización con la progresión en la discapacidad, tanto patológicos como por técnicas de neuroimagen, sin conseguir resultados. Con la utilización de la RM y la mayor facilidad para hacer el diagnóstico se intentó diferenciar entre los distintos tipos de EM así como intentar correlacionar el número de lesiones desmielinizantes (expresadas como número de lesiones hiperintensas en RM potenciada en T2) y con inflamación activa (lesiones que captan contraste en RM potenciada en T1), encontrándose que no existía relación entre la discapacidad y el número de lesiones; aún más, las formas progresivas de la enfermedad mostraban menor actividad inflamatoria que las formas de EMRR. Los pacientes con EMPP sufren un empeoramiento de su estado neurológico con un menor número y tamaño de lesiones, evidenciadas por resonancia magnética, que aquéllos con formas EMRR y EMSP, lo que sugiere que su componente inflamatorio es mucho menor.

En el primer estudio de RM en que se analizó específicamente la EMPP se observó que, a pesar del elevado grado de discapacidad, los pacientes con EMPP tenían menor número de lesiones captantes de gadolinio (sugestivas de inflamación) y de menor tamaño, que los pacientes con EMSP y EMRR¹⁴⁸⁻¹⁴⁹. Además, un estudio posterior en el que se analiza una gran cohorte de pacientes con EMPP procedentes de seis centros europeos ha mostrado claras diferencias entre EMPP y EMSP¹⁵⁰. Estos resultados podrían explicar, en parte, la peor respuesta de estos pacientes a tratamientos anti-inflamatorios como los corticosteroides y apoya la hipótesis de que los mecanismos patogénicos implicados en la EMPP son diferentes a los de las formas

clínicas que cursan en brotes (EMRR y EMSP). El material autópsico, aunque escaso, también demuestra un mayor infiltrado perivascular y mayor celularidad en EMSP que EM PP¹⁵¹.

Existe una correlación entre las imágenes de la RM y la discapacidad de la EM. Estudios transversales han detectado una escasa correlación entre la carga lesional en T2 y la discapacidad¹⁵²⁻¹⁵⁵ aunque el grado de correlación aumenta cuando se utilizan grupo homogéneos de pacientes¹⁵⁶. Por su parte, el número de lesiones captantes de gadolinio se correlaciona débilmente con la tasa de brotes así como con su severidad, pero no se correlaciona de forma consistente con la discapacidad¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. El grado de correlación es más alto ($r=0.75$) entre el incremento de las lesiones hipointensas en T1 y el incremento en la EDA¹⁶¹. También se han correlacionado con la discapacidad tanto la atrofia cerebral como la atrofia medular¹⁶². El incremento del grado de atrofia cerebral se ha correlacionado con el deterioro neurológico medido mediante la EDA pero no con el incremento de la carga lesional en T2 ni con el volumen de nuevas lesiones captantes de gadolinio¹⁶³. La atrofia medular medida en C2 se ha correlacionado también con la EDA. Además, los pacientes con EMSP presentarían un mayor grado de atrofia medular que los que permanecen en EMRR¹⁶².

Por otra parte, se está intentando correlacionar algunos parámetros bioquímicos con la progresión en la EM mediante técnicas de espectroscopia por RM. En concreto, se han valorado los niveles de N-acetil-aspartato (NAA) y se ha comprobado una disminución de los mismos en pacientes con EM con respecto a CS, y mayor aún en pacientes con EMSP comparado con EMRR, lo cual se ha considerado, dada la presencia casi exclusiva de este compuesto en las neuronas, como un marcador de daño axonal. Así mismo, se ha comprobado que su disminución en cerebelo se correlaciona con el grado de discapacidad¹⁶⁴. De la misma manera, utilizando la ERM como

herramienta de estudio, ha aparecido un nuevo concepto: el de sustancia blanca aparentemente normal. Se ha demostrado que en las zonas de sustancia blanca que no parecen mostrar lesiones en técnicas de neuroimagen presentan también una disminución del NAA¹⁶⁵. Esto traduciría la pérdida progresiva de axones secundaria tanto a degeneración walleriana como a un mecanismo propio aún no identificado.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- En nuestro estudio hemos observado que los niveles plasmáticos de OPN están más elevados en pacientes con EMRR durante el brote en comparación a pacientes con EMRR en remisión. Por lo que concluimos que la OPN tiene una función proinflamatoria en la actividad aguda de la enfermedad.
- La observación de encontrar unos niveles de OPN en plasma más elevados en pacientes con EMSP sin progresión de la discapacidad en el año previo, en comparación a pacientes con EMSP con progresión de la discapacidad, refuerza la teoría que la OPN tiene una actividad reparadora o antiinflamatoria. Por lo que concluimos que la OPN tiene una actividad reparadora en la fase progresiva de la EMSP.
- En base a nuestros resultados, es improbable que la OPN esté implicada en la patogénesis de la EMPP, y refuerza la hipótesis de distintos mecanismos moleculares de progresión de la enfermedad entre pacientes con EMSP y EMPP. Concluimos que la OPN no está implicada en la patogenia de la EMPP.
- Los resultados del estudio no muestran diferencias en los niveles plasmáticos de OPN entre pacientes con EMRR en tratamiento con IFN-beta de aquellos no tratados, por lo que concluimos que el IFN-beta no modifica la producción de OPN.

Bibliografía

- 1.- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121-127.
- 2.- Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996, 46:907-11.
- 3.- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33:1444-1452.
- 4.- Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskervi J, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically-based study. 1. Clinical course and disability. *Brain* 1989,112:133-146.
- 5.- Miller DH, Hornabrook RW, Urdie G. The natural history of multiple sclerosis: a regional study with some longitudinal data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:341-346.
- 6.- Weinshenker BG, Rice GPA, Noseworthy JM, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographical based study. 4. Applications to planning and interpretation of clinical therapeutic trials. *Brain* 1991;114:1057-1067.
- 7.- Weinshenker BG, Issa M, Baskerville J. Long-term and short-term outcome of multiple sclerosis. A 3-year follow-up study. *Arch Neurol* 1996;53:353-358.
- 8.- Runmarker B, Andersen O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain* 1993; 116:117-134.

- 9.- Parelius M. Studies on epidemiological, clinical and etiological aspects of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1969; 45 (Suppl 39):1-82.
- 10.- McAlpine D, Compston N. Some aspects of the natural history of disseminated sclerosis. *Quart J Med* 1952; 21:135-167.
- 11.- Weinshenker BG, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 1987; 14:225-261.
- 12.- Poser S, Kurtzke JF, Poser W, Schlaf G. Survival in multiple sclerosis. *J Clin Epidemiol* 1989; 42:159-168.
- 13.- Kurtzke JF, Beebe GW, Nagler B, Kurland LT, Auth TL. Studies on the natural history of multiple sclerosis. VIII. Early prognostic features of the later course of the illness. *J Chron Dis* 1977, 30:819-830.
- 14.- Fisher JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC. For the National MS Society Clinical Outcomes Assessment Task Force. The multiple sclerosis functional composite measure (MSFC): an integrate approach to MS clinical outcome assessment. *Mult Scler* 1999; 5:244-250.
- 15.- Cutter GR, Baier ML, Rudick RA, Cookfair DL, Fisher JS, Petkau J, et al. Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain* 1999; 122:871-882.
- 16.- Kermode AG, Thompson AJ, Tofts P, MacManus DG, Kendall BE, Kingsley DP, et al. Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenic and clinical implications. *Brain* 1990;113:1477-1489.
- 17.- Miller DH, Albert PS, Barkhof F, Francis G, Frank JA, Hodkinson S, et al. Guidelines for the use of magnetic resonance techniques in monitoring the treatment of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:6-16.

- 18.- Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* 1989;117:1419-1428
- 19.- Confavreux C. Predicting the course of multiple sclerosis: myth or reality?. Teaching course: Multiple sclerosis. Chairmen: McDonald WI, Confavreux C. Fifth meeting of the ENS. Munich. Germany. June 17-21, 1995.
- 20.- Minderhoud JM, Van der Hoeven JH, Prange AJA. Course and prognosis of chronic progressive multiple sclerosis. Results of an epidemiological study. *Acta Neurol Scand* 1988;78:10-15.
- 21.- Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Eng J Med* 2000; 343:1430-1438.
- 22.- Rovira A. Resonancia magnética en el diagnóstico y estudio de la historia natural de la esclerosis múltiple. *Neurología* 2001; 16:20-25.
- 23.- Adams CWM. Pathology of multiple sclerosis: progression of the lesion. *Brit Med Bull* 1977; 33:15-20
- 24.- Fazekas F, Offenbacher H, Fuchs S, Schmidt R, Niederkorn K, Horner S, et al. Criteria for increased specificity of MRI interpretation in elderly subjects with suspected multiple sclerosis. *Neurology* 1988;38:1822-1825.
- 25.- Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997;120:2059-2069.
- 26.- Kidd D, Thorpe JW, Thompson AJ, Kendall BE, Moseley IF, MacManus DG, et al. Spinal cord MRI using multi-array coils and fast spin echo. II. Findings in multiple sclerosis. *Neurology* 1993;43:2632-2637.

- 27.- Tartaglino LM, Friedman DP, Flanders AE, Lublin FD, Knobler RL, Liem M, et al. Multiple sclerosis in the spinal cord: MR appearance and correlation with clinical parameters. *Radiology* 1995;195:725-732.
- 28.- Thorpe JW, Kidd D, Moseley IF, Thompson AJ, MacManus DG, Compston DA, et al. Spinal MRI in patients with suspected multiple sclerosis and negative brain MRI. *Brain* 1996;119:709-714.
- 29.-Pericot I, M. Tintoré, E. Grivé, L. Brieva, A. Rovira, X. Montalban. Conversión a esclerosis múltiple clínicamente definida tras un síndrome medular aislado: valor de la RM craneal y medular. *Medicina Clínica (Barc)* 2001;116:214-216.
- 30.- Paty DW. Trial measures in multiple sclerosis: the use of magnetic resonance imaging in the evaluation of clinical trials. *Neurology* 1988; 38:82-83.
- 31.- Miller DH, Grossman IR, Reingold SC, McFarland HF. The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 1998;121:3-24.
- 32.- Miller DH, Runge P, Johnson G, Kendall BE, MacManus DG, Moseley IF, et al. Serial gadolinium enhanced magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Brain* 1988;111:927-939.
- 33.- Grossman IR, González-Scarano F, Atlas SW, Galetta S, Silberberg DH. Multiple sclerosis: gadolinium enhancement in MR imaging. *Radiology* 1986;161:721.725.
- 34.-Miller DH, Austin SJ, Connelly A, Youl BD, Gadian DG, McDonald WI. Proton magnetic resonance spectroscopy of an acute and chronic lesion in multiple sclerosis. *Lancet* 1991; 337:58-59.
- 35.- Grossman IR, Gomori JM, Ramer KN, Lexa FJ, Schnall MD. Magnetization transfer: theory and clinical applications in neuroradiology. *Radiographics* 1994; 14:279-290.

- 36.- Losseff NA, Wang L, Lai HM, Yoo DS, Gawne-Cain ML, McDonald WI, et al. Progressive cerebral atrophy in multiple sclerosis. A serial MRI study. *Brain* 1996; 119:2009-2019.
- 37.-Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897-902.
- 38.- Pericot I, Tintoré M, Falip F, Comabella M, Jardí R, Nos C, et al. Oligoclonal bands are a long-term biological marker in patients with multiple sclerosis. (in press).
- 39.- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Annals of Neurology* 1983;13:227-231.
- 40.- Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Sastre-Garriga J, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. *Neurology* 2003; 14:27-30.
- 41.- Thompson AJ, Montalban X, Barkhof F, Brochet B, Fillippi M, Miller DH, et al. New diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; 47:831-835.
- 42.- Brieva L, Pericot I, Rovira A, Galan I, Nos C, Montalban X. Validation of primary progressive multiple sclerosis criteria in a sample of patients included in a phase II placebo controlled trial. 16th Congress of the ECTRIMS. Toulouse, 7-9 Set de 2000.
- 43.- Bulman DE, Sadonick AD, Cripps J, Ebers GC. Age of onset in siblings concordant for multiple sclerosis. *Brain* 1991; 114:937-950.
- 44.- Olerup O, Hiller J. HLA clase II associated with genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue antigen* 1991; 58:1-15.
- 45.- Villoslada P, Barcellos LF, Río J, Begovich AB, Tintoré M, Sastre-Garriga J, et al. The HLA locus and multiple sclerosis in Spain. Role in

disease susceptibility, clinical course and response to interferon-beta. *J Neuroimmunol* 2002; 130:194-201.

46.- Sotgiu S, Serra C, Marrosu MG, Dolli A, Pugliatti M, Murgia B, et al. Genetic susceptibility to multiple sclerosis in Sardinians: an immunological study. *Acta Neurol Scan* 1998; 98:311-317.

47.- Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1985;1:1313-1315.

48.- Villoslada P, Juste C, Tintoré M, Llorenç VV, Codina A, Pozo-Rosich P, et al. The immune response against herpesvirus is more prominent in the early stages of MS. *Neurology* 2003; 24: 1944-1948.

49.- Brosnan CF, Raine CS. Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathology* 1996;6:243-257.

50.- Martínez-Cáceres EM. Controversias en la patogénia de la esclerosis múltiple. *Neuroinmunología* 1998;2:36-43.

51.- Raine CS. The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol* 1994;36:S61-S63.

52.- Sobel RA, Mitchell M, Fondrem G. Intercellular adhesion molecule- 1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am J Pathol* 1990; 136:1308-1316.

53.- Washington R, Burton J, Tood RF, Newman W, Dragovic L, Dore-Duffy P. Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated CNS microvessels from patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994; 35:89-97.

54.- Martínez-Caceres EM, Espejo C, Brieva L, Pericot I, Tintoré M, Sáez-Torres I, et al. Expression of chemokine receptors in the different clinical forms of multiple sclerosis. *Mult Scle* 2002; 8:390-395.

55.- Nyland H, Matre R, Mork S. T-lymphocyte subpopulations in multiple sclerosis lesions. *N Eng J Med* 1982; 307:1643-1644.

- 56.- Olsson T. Immunology of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1992; 5:195-199.
- 57.- Morgan BP, Cambell AK, Compston DAS. Terminal component of complement (C9) in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 1984; ii:251-254.
- 58.- Raine CS. Oligodendrocytes and central nervous system myelin, in Baltimore, MD, Williams and Wilkins. 1990;115-140.
- 59.- Hofman FM, Hinton FDR, Jonson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1989;170:607-612.
- 60- Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 1988;23:339-343.
- 61.- Sharief M, Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:467-473.
- 62.- Selmaj K, Raine CS, Farooq M, Norton WT, Brosnan CF. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes: apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 1991; 147:1522-1527.
- 63.- Bansil S, Cook SD, Rohowsky-Kochan C. Multiple sclerosis: immune mechanism and update on current therapies. *Ann Neurol* 1995;37:S87-S93.
- 64.- Lassmann H. Comparative neuropathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. Nueva York: Springer Verlag 1983;37-72.
- 65.- Bruch W, Schmied M, Suchanek G, Brück Y, Breitschopf H, Poser S, et al. Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994; 35:65-73.
- 66- Anthony DC, Hughes P, Perry VH. Evidencias a favor de una pérdida axonal primaria en la esclerosis múltiple. *Rev. Neurol* 2000; 30: 1203-1208.
- 67.- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in

- acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120: 393-399.
- 68.- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 3338: 278-285.
- 69.- Trapp B, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Current Opinion Neurology* 1999;12:295-302.
- 70.- Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 107;161-166.
- 71.- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesion: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47:707-717.
- 72.- Hofman FM, Von Hanwehr IR, Dinarello CA, Mizel SB, Hinton D, Merrill JE. Immunoregulatory molecules and IL2 receptors identified in multiple sclerosis brain. *J Immunol* 1986; 136:3239-3245.
- 73.- Traugott U, Lebon P. Interferon-gamma and 1a antigen are present on astrocytes in multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 1988, 84:257-264.
- 74.- Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. Identification of lymphotoxin and tumour necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 1991; 87:949-954.
- 75.- Carson W, Giri J, Lindemann M, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994; 180:1395-1403.
- 76.- Fassbender K, Mielke O, Bertsch T, Muehlhauser F, Hennerici M, Kurimoto M, et al. Interferon-gamma inducing factor (IL-18) and interferon gamma in inflammatory CNS disease. *Neurology* 1999; 53:1104-1106.

- 77.- Nicoletti F, Di Marco R, Mangaro K, Patti F, Reggio E, Nicoletti A, et al. Increased serum levels of interleukin-18 in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 57:342-344.
- 78.- Woodrooffe MN, Cuzner ML. Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: detection by non-radioactive *in situ* hybridisation. *Cytokine* 1993; 5:583-588.
- 79.- Parekh RB, Swek RA, Rademacher TW, Opdenakker G, Van Damme J. Glycosylation of interleukin-6 purified from normal human blood mononuclear cells. *Eur J Biochem* 1992; 203:135-141.
- 80.- Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem* 1990; 266:2017-2020.
- 81.- Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995; 37:424-435.
- 82.- Duran I, Martinez-Caceres EM, Brieva L, Tintoré M, Montalban X. Similar pro- and anti-inflammatory cytokine production in the different clinical forms of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2001, 7:151-156.
- 83.- Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11:279-303.
- 84.- Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:460-465.
- 85.- Denhardt D, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993; 7:1475-1482.
- 86.- Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 2000; 19:615-622.
- 87.- Miyazaki Y, Tashiro T, Higuchi Y, Setoguchi M, Yamamoto S, Nagai H, et al. Expression of osteopontin in a macrophage cell line and in transgenic mice with pulmonary fibrosis resulting from the

lung expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene. *Ann New York Acad Sci* 1995; 760:334-341.

88.- Xie J, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int* 2001; 60:1645-1657.

89.- Shijubo N, Uede T, Kon S, Nagata M, Abe S. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in tumor biology. *Crit Rev Oncog* 2000; 11:135-146.

90.- Singhal H, Bautista DS, Tonkin KS, O'Malley FP, Tuck AB, Chambers AF, et al. Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res* 1997; 3:605-611.

91.- Zhang J, Takahashi H, Takahashi F, Shimizu K, Ohsita F, Kameda Y, et al. Differential osteopontin expression in lung cancer. *Cancer Lett* 2001; 171:215-222.

92.- O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 2000; 81:373-390.

93.- Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000; 287:860-864.

94.- O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching and old dog new tricks. *Immunol Today* 2000; 21:475-478.

95.- O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* 1999; 162:1024-1031.

96.- Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murny CE, Almeida M. Evidence for a role on osteopontin in macrophage infiltration in

response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 1998; 152:353-358.

97.- O'Regan AW, Hayder JM, Berman JS. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* 2000; 68:495-502.

98.- Patarca R, Saavedra RP, Canton H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: role of early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol* 1993; 13:225-246.

99.- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling and cell survival. *J Clin Invest* 2001; 107:1055-1056.

100.- Tian JY, et al. Regulation of NO synthesis induced by inflammatory mediators in RAW264.7 cells: collagen prevents inhibition by osteopontin. *Cytokine* 2000; 12:450-457.

101.- Chabas D, Baranzini S, Mitchell D, Bernard C, Rittling S, Denhardt D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001; 23:1731-1735.

102.- Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, Klein L, Cantor H. Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol* 2002; 168:2096-2099.

103.- Caillier S, Barcellos LF, Baranzini SE, Swerdlin A, Lincoln RR, Steinman L, et al. Osteopontin polymorphisms and disease course in multiple sclerosis. *Genes Immun* 2003; 4:312-315.

104.- Palace J. Clinical and laboratory characteristics of secondary progressive MS. *J Neurol Sci* 2003; 206:131-134.

105.- Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with

- demyelination and inflammation. *Brain* 2000; 123: 1174-1183.
- 106.- Nicoletti F, Patti F, Cocuzza C, Zaccone P, Nicoletti A, Di Marco R, et al. Elevated serum levels of interleukin-12 in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1996;70:87-90.
- 107.- Balashov KE, Smith DR, Khoury SJ, Hafler DA, Weiner HL. Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:599-603.
- 108.- Comabella M, Balashov K, Issazadeh S, Smith D, Weiner HL, Khoury SJ. Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy. *J Clin Invest* 1998;102:671-678.
- 109.- van Boxel-Dezaire AH, Smits M, van Trigt-Hoff SC, Killestein J, van Houwelingen JC, Polman CH, et al. Cytokine and IL-12 receptor mRNA discriminate between different clinical subtypes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001;120:152-160.
- 110.- van Boxel-Dezaire AK, Hoff SC, van Oosten BW, Verweij CL, Drager AM, Ader HJ, et al. Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999;45:695-703.
- 111.- Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi M, et al. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1997;120:1085-1096.
- 112.- Revesoz T, Kidd D, Thompson AJ, Barnardct RO, McDonald WI. A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1994;117:759-765.
- 113.- Duran I, Martinez-Caceres EM, Río J, Barbera N, Marzo ME, Montalban X. Immunological profile of patients with primary progressive multiple sclerosis. Expression of adhesion molecules. *Brain* 1999;122:2297-2307.

- 114.- McDonnell GV, McMillan SA, Douglas JP, Droogan AG, Hawkins SA. Serum soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: raised sVCAM-1, sICAM-1 and sE-selectin in primary progressive disease. *J Neurol* 1999;246:87-92.
- 115.- Giovannoni G, Lai M, Thorpe J, Kidd D, Chamoun V, Thompson AJ, et al. Longitudinal study of soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: correlation with gadolinium enhanced magnetic resonance imaging. *Neurology* 1997;48:1557-1565.
- 116.- Killestein J, Den Drijver BF, Van der Graaff WL, Uitdehaag BM, Polman CH, Van Lier RA. Intracellular cytokine profile in T-cell subsets of multiple sclerosis patients: different features in primary progressive disease. *Mult Scler* 2001;7:145-150.
- 117.- Cottrell DA, Kremenchutzky M, Rice GP, Koopman WJ, Hader W, Baskerville J, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 5. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1999;122:625-639.
- 118.- Pirtila T, Nurmikko T. CSF oligoclonal bands, MRI, and the diagnosis of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1995;92:468-471.
- 119.- Acarín N, Río J, Fernández AL, Tintoré M, Durán I, Galán I, et al. Different antiganglioside antibody pattern between relapsing-remitting and progressive MS. *Acta Neurol Scand* 1996;93:99-103.
- 120.- Sadatipour BT, Greer JM, Pender MP. Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998;44:980-983.
- 121.- Giovannoni G, Thorpe JW, Kidd D, Kendall BE, Moseley IF, Thompson AJ, et al. Soluble E-selectin in multiple sclerosis: raised concentrations in patients with primary progressive disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60:20-26.
- 122.- McDonnell GV, McMillan SA, Douglas JP, Droogan AG, and Hawkins SA. Raised CSF levels of soluble adhesion molecules across

the clinical spectrum of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1998; 85:186-192.

123.- Alcazar A, Regidor I, Masjuan J, Salinas M, Alvarez-Cermeño JC. Induction of apoptosis by cerebrospinal fluid from patients with primary-progressive multiple sclerosis in cultured neurons. *Neurosci Lett* 1998;255:75-78.

124.- Río J, Nos C, Tintoré M, Borràs C, Galan I, Comabella M, et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol* 2002;53:400-406.

125.- Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 1994;145:1450-1462.

126.- Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K, et al. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney int* 1999;56:571-580.

127.- Jiang XJ, Feng T, Chang LS, Kong XT, Wang G, Zhang ZW, et al. Expression of osteopontin mRNA in normal and stone-forming rat kidney. *Urol Res* 1998;26:389-394.

128.- Wang X, Louden C, Yue TL, Ellison JA, Barone FC, Solleveld HA, et al. Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. *J Neurosci* 1998;18:2075-2083.

129.- Rittling SR, Denhardt DT. Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp Nephrol* 1999;7:103-113.

130.- Malyankar UM, Scatena M, Suchaland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteopontin is an alpha vbeta3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:20959-20962.

131.- Lin YH, Huang CJ, Chao JR, Chen ST, Lee SF, Yen JJ, et al. Coupling of osteopontin and its cell surface receptor CD44 to the cell

survival response elicited by interleukin-3 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Cell Biol* 2000;20:2734-2742.

132.- Mitrovic B, Ignarro LJ, Montestruque S, Smoll A, Merrill JE. Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: its differential effects on primary glial cells in vitro. *Neuroscience* 1994;61:575-585.

133.- Merrill JE, Ignarro LJ, Scherman MP, Melinak J, Lane TE. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 1993;151:2132-2141.

134.- Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology* 1997;138:3849-3858.

135.- Gilmore Ap, Metcalfe AD, Romer LH, Streuli CH. Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* 2000;149:431-446.

136.- Makino H, Sugiyama H, Kashihara N. Apoptosis and extracellular matrix-cell interactions in kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2000;77:S67-75.

137.- Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Bruck W, Hohlfeld R, Lassmann H. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells?. *Brain* 2002;125:75-85.

138.- Kerschensteiner M, Staldemann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol* 2003;53:292-304.

139.- Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996;45:322-333.

140.- Philippe J, Debruyne J, Leroux-Roels G, Willems A, Dereuck J. In vitro TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma production as markers of

relapses in multiple sclerosis. *Clin neurol Neurosurg* 1996;98:286-290.

141.- Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Broocks A, et al. Tumor necrosis factor-alfa messenger RNA expression in patients with multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol* 1995;37:82-87.

142.- Navikas V, He B, Link J, Haglund H, Soderstrom M, Fredrikson S, et al. Augmented expression of tumor necrosis alfa and lymphotoxin in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. *Brain* 1996;119:213-223.

143.- Ferrante P, Fusi ML, Saresella M, Caputo D, Biasin H, Trabattoni D, et al. Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: altered IL-12 production and augmented signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expressing lymphocytes in acute multiple sclerosis. *J Immunol* 1998;160:1514-1521.

144.- Correale J, Gilmore W, McMillan M, Li S, McCarthy K, Le T, et al. Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein-specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. *J Immunol* 1995;154:1959-2968.

145.- Tejada-Simon MV, Zang YC, Yang D, Hong J, Li S, Singh RA, et al. Aberrant T cell responses to myelin antigens during clinical exacerbation in patients with multiple sclerosis. *Int Immunol* 2000;12:1641-1650.

146.- Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:285-294.

147.- European Study group on interferon beta-1b in secondary progressive MS. Placebo-controlled multicentre randomised trial of

interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Lancet* 1998;352:1491-1497.

148.- Thompson AJ, Kermode AG, MacManus DG, Kendall BE, Kingsley DPE, Moseley IF, McDonald WI. Patterns of disease activity in multiple sclerosis: a clinical and magnetic resonance imaging study. *BMJ* 1990;300:631-634.

149.- Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi M, et al. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1997;120:1085-1096.

150.- Stevenson VL, Miller DH, Rovaris M, Barkhof F, Brochet B, Dousset V, et al. Primary progressive and transitional progressive multiple sclerosis: a clinical and MRI cross sectional study. *Neurology* 1999;52:1-7.

151.- Revesz T, Kidd D, Thompson AJ, Barnard RO, McDonald WI. A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1994; 117:759-765.

152.- Kappos L, Städt D, Keil W, Ratzka M, Heitzer T, Scheneiderbanger-Grygiers. An attempt to quantify magnetic resonance imaging in multiple sclerosis-correlation with clinical parameter. *Neurosurg Rev* 1987;10:133-135.

153.- Baumhefner RW, Tourtellote WW, Syndulko K, Waluch V, Ellison GW, Meyers LW, et al. Quantitative multiple sclerosis plaque assessment with magnetic resonance imaging. Its correlation with clinical parameters, evoked potentials, and intra-blood-brain barrier IgG sintesis. *Arch Neurol* 1990;47:19-26

154.- Gass A, Barker GJ, Kidd D, Thorpe JW, McManus D, Brennan A, et al. Correlation of magnetization transfer ratio with clinical disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994;36:62-67

155.- Filippi M, Paty DW, Kappos L, Barkhof F, Compston DAS, Thompson AJ, et al. Correlations between changes in disability and

T2-weighted brain MRI activity in multiple sclerosis: A follow-up study. *Neurology* 1995;45:255-260.

156.- Filippi M, Horsfield MA, Morrissey SP, MacManus DG, Rudge P, McDonald WI, et al. Quantitative brain MRI lesion load predicts the course of clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Neurology* 1994;44:635-641.

157.- Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, McFarland HF. The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 1998;121:3-24

158.- Miller DH, Barkhof F, Nauta JJ. Gadolinium enhancement increases the sensitivity of MRI in detecting disease activity in multiple sclerosis. *Brain* 1993;116:1077-1094

159.- Grossman RI, Gonzalez-Scarano F, Atlas SW, Galetta S, Silberberg DH. Multiple sclerosis: gadolinium enhancement in MRI imaging. *Radiology* 1986;161:721-725.

160.- Harris JO, Frank JA, Patronas N, McFarlin DE, McFarland HF. Serial gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging scans in patients with early, relapsing-remitting multiple sclerosis: implications for clinical trials and natural history *Ann Neurol* 1991;29:548-55.

161.- Van Walderveen MAA, Barkhof F, Hommes OR, Polman CH, Tobi H, Fresquin STFM, et al. Correlating MRI and clinical disease activity in multiple sclerosis: relevance of hypointense lesions on short-TR/short-TE (t1-weighted) spin-echo images. *Neurology* 1995;45:1684-1690.

162.- Losseff NA, Webb SL, O'Riordan JI, Page R, Wang L, Barker GJ, et al. Spinal cord atrophy and disability in multiple sclerosis. A new reproducible and sensitive MRI method with potential to monitor disease progression. *Brain* 1996;119:701-708.

163.- Losseff NA, Wang L, Lai HM, Yoo DS, Gawne-Cain ML, McDonald WI, et al. Progressive cerebral atrophy in multiple sclerosis. A serial MRI study. *Brain* 1996;119:2009-2019.

164.- Arnold DL, Matthews PM, Francis GS, O'Connor J, Antel JP. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging for metabolic characterization of demyelinating plaques. *Ann Neurol* 1992;31:235-241.

165.- Fu L, Matthes PM, De Stefano N, Worsley KJ, Narayanan S, Francis GS, et al. Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain* 1998;121:103-113.