

**ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN LA  
ESCLEROSIS MÚLTIPLE FAMILIAR :  
citocinas, moléculas de adhesión y  
receptores de quimiocinas**

**Ana Malagelada Seckler**

**2003**

" No dejaremos de explorar  
Y el final de la exploración será  
Llegar al punto de partida  
Y conocer el sitio por primera vez."

T.S.ELIOT

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores de tesis, Dr. Xavier Montalbán Gairín, por haberme dado la posibilidad de realizar la tesis sobre Esclerosis Múltiple y por haberme brindado todo el apoyo necesario para poder llevarla a cabo, y a la Dra. Eva Martínez-Cáceres, por guiarme tan amablemente en mis primeros pasos dentro del complejo campo de la inmunología.

A todo el personal médico de la Unitat de Neuroimmunologia Clínica del Hospital Universitari Vall d'Hebron (UNIC), Dra. Mar Tintoré, Dr. Carlos Nos, Dr. Jordi Ríó, Dr. Pablo Díaz (ex-miembro), Dr. Luis Brieva (ex-miembro) y Dr. Manolo Comabella, por haberme facilitado el acceso a los pacientes que he incluido en el estudio. Un agradecimiento especial para los demás miembros de la UNIC, M<sup>a</sup> José Vicente, Rosalía Horno, Elisabeth Morilla, Núria Valcárcel, Dúnia Muñoz, Josep Graells y Lluís Barràs, que siempre han estado dispuestos a echarme una mano cuando lo he necesitado.

A la Dra. María Demestre, pieza clave e imprescindible para la realización de esta tesis, dada su inestimable ayuda en el análisis de los parámetros inmunológicos estudiados. Gracias, además, por haberme ayudado siempre, y con buen humor, a resolver mis dudas técnicas.

A Carmen Espejo, por ayudarme a depurar muchos aspectos de la tesis, sobre todo en la última etapa de su elaboración.

A todo el personal sanitario y administrativo del Centro de Asistencia Primaria de Horta. Un agradecimiento especial a Isi de la Iglesia.

Al Dr. Alejandro Allepuz, por su esfuerzo para realizar el análisis estadístico de esta tesis, y por su paciencia a la hora de resolver mis dudas estadísticas.

A todo el Servicio de Neurología, y, en especial, al Jefe de Servicio Dr. Agustí Codina Puiggrós, por haberme ayudado a adquirir mis conocimientos sobre Neurología durante mi formación como Médico Interno Residente.

Al Dr. Nolasc Acarín por sus tan sabios y acertados consejos al inicio de mi andadura como Médico Interno Residente y por su apoyo incondicional.

A todos mis amigos.

Un agradecimiento muy especial a mis padres, Annemarie y Juan, a mi hermano Joan y a mi esposo Santiago, por darme, todos ellos, continuadas muestras de su amor, pilar fundamental de mi vida.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN .....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CONCEPTO DE ESCLEROSIS MULTIPLE .....	2
1.2. ANATOMÍA PATOLÓGICA .....	2
1.3. EPIDEMIOLOGÍA .....	3
1.4. FORMAS CLÍNICAS DE EVOLUCIÓN .....	6
1.5. ETIOPATOGENIA .....	8
1.5.1. Virus .....	8
1.5.2. Factores ambientales .....	10
1.5.3. Susceptibilidad genética.....	11
1.5.4. Proceso patogénico .....	14
1.5.4.1. <i>Inicio de la respuesta autoinmune</i> .....	15
1.5.4.2. <i>Paso de los linfocitos T activados al SNC</i> .....	16
1.5.4.3. <i>Inflamación y desmielinización</i> .....	18
1.6. QUIMIOCINAS Y RECEPTORES DE QUIMIOCINAS .....	21
1.6.1. Concepto y características .....	21
1.6.2. Producción de quimiocinas por células T encefalitogénicas .....	24
1.6.3. Quimiocinas y receptores de quimiocinas en la EAE.....	24
1.6.4. Quimiocinas en la EM.....	25
1.6.4.1. <i>LCR</i> .....	25
1.6.4.2. <i>Sangre periférica</i> .....	26
1.6.4.3. <i>Tejido cerebral</i> .....	26
1.7. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN .....	28
1.7.1. Concepto y clasificación .....	28
1.7.2. Características .....	28
1.7.2.1. <i>Selectinas</i> .....	28
1.7.2.2. <i>Integrinas</i> .....	30

1.7.2.3. Superfamilia de las Inmunoglobulinas . . . . .	31
1.7.3. Moléculas de adhesión y EAE . . . . .	32
1.7.4. Moléculas de adhesión y EM . . . . .	33
1.7.4.1. Expresión selectiva de las MA en el SNC . . . . .	33
1.7.4.2. Expresión de las MA por los linfocitos T . . . . .	34
1.7.4.3. MA circulantes en la EM . . . . .	34
1.8.CITOCINAS . . . . .	36
1.8.1. Concepto y características . . . . .	36
1.8.2. Citocinas y EAE . . . . .	38
1.8.3. Citocinas y EM . . . . .	38
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS . . . . .	43
2.1. HIPÓTESIS . . . . .	44
2.2. OBJETIVOS . . . . .	44
3. MATERIAL Y MÉTODO . . . . .	45
3.1.SUJETOS . . . . .	46
3.1.1. Familias EM Multiplex . . . . .	46
3.1.2. Pacientes . . . . .	47
3.1.2.1. Pacientes índice . . . . .	47
3.1.2.2. Familiares EM . . . . .	47
3.1.2.3. Familiares sanos . . . . .	48
3.1.3. Grupo control sano . . . . .	48
3.2.REACTIVOS/TAMPONES . . . . .	49
3.3.ANTICUERPOS MONOCLONALES . . . . .	50
3.4.OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC). . . . .	51

3.5.DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y RECEPTORES DE QUIMIOCINAS EN PBMC . . . . .	51
3.5.1. Descongelación de las PBMC . . . . .	51
3.5.2. Tinción de superficie . . . . .	52
3.5.3. Análisis de la expresión en membrana celular de las moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas . . . . .	53
3.6.DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN PBMC . . . . .	55
3.6.1. Descongelación de las PBMC . . . . .	55
3.6.2. Estimulación de las PBMC . . . . .	55
3.6.3. Tinción intracelular para la determinación de la producción de citocinas . . . . .	56
3.6.4. Análisis de la producción de citocinas . . . . .	57
3.7.ANÁLISIS ESTADÍSTICO . . . . .	57
 4. RESULTADOS . . . . .	 59
4.1.ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO . . . . .	60
4.1.1. Grupo de pacientes . . . . .	60
4.1.1.1. <i>Edad y sexo</i> . . . . .	60
4.1.1.2. <i>Variables clínicas</i> . . . . .	61
4.1.2. Grupo control . . . . .	62
4.1.3. Comparación entre pacientes y grupo control . . . . .	62
4.1.3.1. <i>Edad y sexo</i> . . . . .	62
4.2.ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS . . . . .	63
4.2.1. Análisis de la producción de Interferón- $\gamma$ . . . . .	63
4.2.2. Análisis de la producción de Interleucina-6 . . . . .	67
4.3.ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN . . . . .	69
4.3.1. Análisis de la expresión de L-selectina . . . . .	69
4.3.2. Análisis de la expresión de VLA-4 . . . . .	74



4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS . . . . .	80
4.4.1. Análisis de la expresión de CCR5 . . . . .	80
4.4.2. Análisis de la expresión de CXCR3 . . . . .	84
4.5. RESÚMEN DE RESULTADOS . . . . .	87
4.6. TABLA DE RESULTADOS . . . . .	88
<b>5. DISCUSIÓN . . . . .</b>	<b>89</b>
5.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE FAMILIAR . . . . .	90
5.2. CITOCINAS . . . . .	92
5.2.1. INF- $\gamma$ . . . . .	92
5.2.2. IL-6 . . . . .	95
5.3. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN . . . . .	96
5.3.1. L-Selectina . . . . .	96
5.3.2. VLA-4 . . . . .	98
5.4. RECEPTORES DE QUIMIOCINAS . . . . .	100
5.4.1. CCR5 . . . . .	100
5.4.2. CXCR3 . . . . .	101
<b>6. CONCLUSIÓN . . . . .</b>	<b>103</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA . . . . .</b>	<b>105</b>

## **ABREVIATURAS**

Ac: Anticuerpos  
AcMo: Anticuerpo monoclonal  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
Ag: Antígeno  
APC: Aloficocianina  
ARN: Ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
BHE: Barrera hematoencefálica  
CC: Citocinas  
CD: "Cluster designation"  
CPA: Células presentadoras de antígeno  
EAE: Encefalomiелitis autoinmune experimental  
EBV: Virus Epstein Barr  
ELR: Motivo glutamato-leucina-arginina  
EM: Esclerosis múltiple  
EMCP: Esclerosis múltiple crónica progresiva  
EMPP: Esclerosis múltiple primariamente progresiva  
EMPR: Esclerosis múltiple progresiva recurrente  
EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente  
EMSP: Esclerosis múltiple secundariamente progresiva  
FCS: Suero de ternera fetal  
FITC: Isotiocianato de fluoresceína  
FSC: "Forward light scatter"  
HLA: Antígeno de histocompatibilidad  
HSV-1: Virus herpes tipo 1  
HSV-6: Virus del herpes *hominis* tipo 6  
ICAM: Molécula de adhesión intercelular  
IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina  
IL: Interleucina  
IMF: Intensidad media de fluorescencia  
LCR: Líquido cefalorraquídeo  
LFA: Antígeno asociado a la función leucocitaria  
LPS: Lipopolisacárido  
LT: Linfotóxina  
MA: Moléculas de adhesión  
MOG: Glicoproteína mielínica oligodendroglial  
NK: "Natural killer"  
PBL: Linfocitos de sangre periférica  
PBM: Proteína básica de la mielina  
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica  
PBS: Tampón fosfato salino  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PE: Ficoeritrina  
PerCP: Proteína clorofílica de *peridinium*  
PLP: Proteína proteolipídica  
PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato  
QC: Quimiocinas  
RM: resonancia magnética  
SNC: Sistema Nervioso Central  
SSC: "Side light scatter"  
TCR: Receptor de los linfocitos T  
TGF: Factor de transformación del crecimiento  
Th: Células T "helper"  
TNF: Factor de necrosis tumoral  
VCAM: Molécula de adhesión a células vasculares  
VVZ: Virus Varicela Zóster

## **RESUMEN**

En la Esclerosis múltiple (EM) existe una agregación familiar que viene demostrada por la mayor incidencia de la enfermedad en los familiares de los pacientes, la elevada concordancia en los gemelos monocigotos y la existencia de una susceptibilidad genética ligada a determinados haplotipos del sistema HLA. Por otro lado, existen evidencias del carácter autoinmune de la EM y el aumento de la incidencia de otras enfermedades autoinmunes en los familiares de los pacientes.

Hemos querido comprobar la hipótesis de que existen ciertas características inmunológicas innatas que comparten los pacientes con EM y sus familiares sanos que podrían colaborar en la mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad.

Para ello hemos estudiado, mediante tinción intracitoplasmática en células mononucleares de sangre periférica de 13 familias EM multiplex (21 pacientes con EMRR, 5 pacientes con EMSP y 29 familiares sanos de primer o segundo grado) y 26 controles sanos apareados por edad y sexo, seis moléculas que juegan un demostrado papel en la patogenia de la EM: dos citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-6), dos moléculas de adhesión (L-selectina, VLA-4) y dos receptores de quimiocinas (CCR5 y CXCR3).

Los resultados del estudio han demostrado un aumento de la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos de los pacientes y sus familiares sanos con respecto a los controles sanos, así como una menor expresión de la L-selectina en los monocitos de los controles con respecto a los pacientes y sus familiares sanos.

Confirman estos hallazgos que los pacientes con EM y sus familiares sanos comparten ciertos rasgos inmunológicos que indican un mayor grado de activación de las células de su sistema inmune, lo que podría reflejar la mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE. CONCEPTO**

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica que puede afectar la sustancia blanca de cualquier parte del sistema nervioso central. La lesión característica consiste en la desmielinización segmentaria de la sustancia blanca del sistema nervioso central (SNC), asociada a un infiltrado inflamatorio perivascular. Se conoce también por el nombre de esclerosis en placas, término acuñado por Charcot en 1868<sup>1</sup>, dada su característica de presentar placas glióticas diseminadas por el SNC.

Hablamos de EM familiar o EM multiplex cuando en una familia padece la enfermedad más de un miembro de primera o segunda generación.

## **1.2. ANATOMIA PATOLÓGICA**

La EM se caracteriza desde un punto de vista neuropatológico por la presencia de múltiples placas de desmielinización en distintos estadios evolutivos, frecuentemente subependimarias, junto a un grado variable de lesión axonal<sup>2,3</sup>, como ya mencionó JM Charcot en 1868, y un infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario perivascular.

Las placas suelen medir entre 2 mm y 6 cm. Existe una clara relación entre las placas de desmielinización y las estructuras vasculares: casi todas las de pequeño o mediano tamaño están centradas por una vena, y en las mayores, esta relación es evidente en sus márgenes, que se extienden a lo largo de venas que atraviesan y salen de la placa.

Las placas tienen cierta predilección por determinadas localizaciones, aunque realmente pueden encontrarse en cualquier punto del SNC. Son casi constantes en la sustancia blanca subependimaria o periventricular (ventrículos laterales y 4º ventrículo), en el límite entre la sustancia gris cortical y la blanca subcortical, en los nervios, quiasma y cintillas ópticas, en el tronco cerebral, pedúnculos y laminillas cerebelosas, y en la médula espinal.



Como se ha comentado antes, las placas de desmielinización se hallan en diferentes estadios evolutivos. Hablamos de placas crónicas activas, placas crónicas inactivas y placas en remielinización o placas "en sombra".

Las placas crónicas activas, son aquellas en las que está ocurriendo el proceso de destrucción de la mielina, y se caracterizan por la presencia de macrófagos en los márgenes de la placa. Es constante la presencia de un infiltrado inflamatorio linfocitario perivascular en el entorno de la placa activa y, menos frecuentemente, en el seno de la misma. Clásicamente se acepta que en el seno y periferia de la placa de desmielinización los axones están relativamente conservados, aunque ya Charcot en su descripción original de 1868 mencionara algunas alteraciones en los mismos. En los últimos años varios autores han señalado que el daño axonal podría ser la causa de alteraciones neurológicas permanentes <sup>4,5,6,7</sup>.

Las placas crónicas inactivas son lesiones hipocelulares totalmente carentes de mielina y con una marcada gliosis fibrilar. Los oligodendrocitos están ausentes o son muy escasos. Hay solo escasa celularidad inflamatoria alrededor de los vasos próximos a la placa.

Las placas en remielinización o placas "en sombra" son áreas de remielinización defectuosa. Existe controversia sobre el origen de las células que se encargan de la remielinización. Aunque los oligodendrocitos pueden hallarse preservados en la fase aguda de la desmielinización, existen dudas de que sean estas células las responsables de la remielinización, y estudios experimentales recientes sugieren que las responsables serían células gliales progenitoras indiferenciadas <sup>8</sup>.

### **1.3. EPIDEMIOLOGÍA**

La EM se ha considerado históricamente como una enfermedad de climas fríos y latitud alta, y hoy en día esta idea sigue teniendo vigencia parcialmente, pues las cifras de prevalencia pueden llegar a ser muy altas en regiones nórdicas como Escocia y, en general, el norte de Europa y Estados Unidos, donde superan los 100 casos por 100.000 habitantes.

No ocurre así, en cambio, en los Países Árabes, Hispano-América, Asia y en especial en Japón, donde la prevalencia es más baja.

Los datos actuales de que disponemos en España hacen pensar que la prevalencia en nuestro país puede superar los 50 casos por 100.000 habitantes, y alcanza hasta 57 casos, cifras similares a otros países mediterráneos como Grecia, Italia, Yugoslavia y en otras áreas geográficas de latitudes intermedias y con climas templados o cálidos. En España se han concluido al menos 9 estudios epidemiológicos de EM (Tabla 1.1.)<sup>9</sup>.

La EM es la enfermedad neurológica crónica más frecuente y una de las principales causas de discapacidad en adultos jóvenes, superado únicamente por traumatismos<sup>10</sup>. La edad de máxima incidencia se sitúa alrededor de los 30 años<sup>11,12</sup>, permanece alta durante la cuarta década y declina posteriormente, siendo muy poco frecuente que se inicie después de los 60 años.

Es una enfermedad más frecuente en el sexo femenino. La ratio se sitúa entre 1,4 y 3,1<sup>13</sup>. Esta mayor susceptibilidad podría estar en relación con factores hormonales<sup>12</sup>.

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que la EM es una enfermedad con agregación familiar. Esta mayor incidencia familiar ya fue descrita hace casi un siglo por Charcot JM<sup>14</sup>, y fue Eichorst H<sup>15</sup> en 1986, quien etiquetó a la EM de “enfermedad hereditaria transmisible.”

El primer estudio en Gran Bretaña lo llevó a cabo McAlpine en 1955<sup>16</sup>, quien describió 8 ejemplos de EM familiar en una serie de 142 pacientes.

Sadovnick y col.<sup>17</sup> hallaron que el riesgo aproximado para un hijo era del 2.5% y para un hermano del 3.8%. Otro estudio posterior por el mismo autor<sup>18</sup>, demostró que el riesgo de un hermano de un paciente con EM aumenta 3.5 veces más si además padecen la enfermedad uno de los dos padres, y aumenta 5 veces, si el hermano padece una EM de inicio temprano (menor o igual a 20 años). En general, los familiares de primer grado presentan un riesgo 30 a 50 superior al riesgo del 0.1% de la población general. Robertson y col.<sup>19</sup> hallaron que el riesgo se reduce desde el 2.77% en familiares de primer grado al 1.02% en familiares de segundo y tercer grado.

Un estudio recientemente publicado de Sadovnick y col.<sup>20</sup>, halla un riesgo en los hermanos de padres consanguíneos, significativamente más alto que en los hermanos

de pacientes EM de padres no consanguíneos. Esto apoya el concepto de que la interacción de múltiples genes aumenta el riesgo de padecer EM.

TABLA 1.1. Estudios epidemiológicos de EM realizados en España (adaptado de Fernández O, 2000<sup>9</sup>)

<b>AÑO</b>	<b>LUGAR</b>	<b>LATITUD</b>	<b>POBLACIÓN</b>	<b>PREVALENCIA</b>	<b>AUTOR</b>
1968	Cataluña	42°N		6	O.de la Riva
1983	L.Palmas	29°N	715,177	6	Sosa
1983	Cantabria	43°N	522,000	5	Miró
1986	Málaga	37°N	1,036,961	11	Fernández
1987	Aragón	42°N	1,230,000	9	Barduzal
1988	Alicante	38°N	133,915	17	Martín
1988	Salamanca	40°N	368,055	11	Ruíz
	Zamora	41°N	224,369	12	" "
1988	Lanzarote	28°N	60,000	15	García
1991	Gijón	43°N	81,462	23	Uría
1991	Navarra	42°N	516,000	16	Antón
1994	Vélez-M	36°45'N	36,104	52(32-82)	Fernández
1994	Vic	41°50'N	71,985	57(40-74)	Bufill
1995	Segovia	40°55'N	53,774	56(36-76)	Sempere
1996	Gijón	43°35'N	33,520	65(38-92)	Uría
1997	Teruel	40°25'N	143,680	32(23-41)	Modrego
1998	Calatayud	41°20'N	58,591	58(39-78)	Pina
1998	Móstoles	40°20'N	195,979	43(35-54)	Benito
1999	Valladolid	41°39'N	92,632	58(44-76)	Tola
2000	Alcoi	38°N	130,786	41(31-54)	Mallada
2001	Baleares		67,009	68(50-91)	Casquero

## 1.4. FORMAS CLINICAS DE EVOLUCION

En la EM se han identificado cuatro cursos clínicos de evolución <sup>21</sup> (Figura 1.1.):

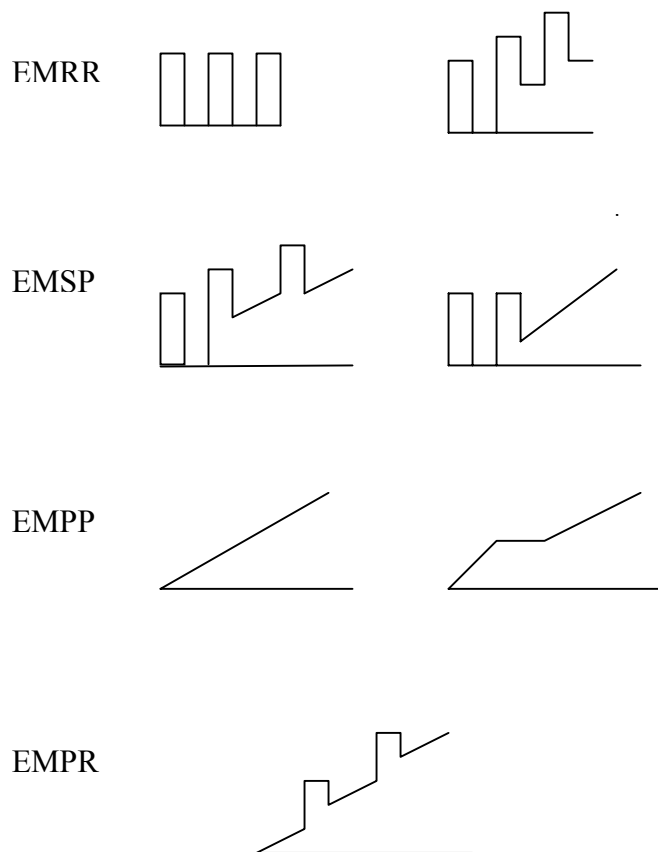
- **EMRR (EM remitente-recurrente):** caracterizado por brotes clínicos seguidos de una remisión total o parcial de los síntomas . Esta forma clínica de evolución es una de las más frecuentes; aproximadamente la presentan un 85% de los pacientes.
- **EMSP (EM secundariamente progresiva):** caracterizada por una progresión de la discapacidad, con o sin brotes intercalados, tras una fase remitente-recurrente. Hasta un 50% de los pacientes con EMRR pueden evolucionar hacia esta forma de progresión, observándose un deterioro continuado aún en ausencia de brotes claramente definidos.
- **EMPP (EM primariamente progresiva):** es una forma progresiva desde su inicio que afecta a un 10-15% de los pacientes y en la que no hay evidencia de brotes.
- **EMPR (EM progresiva recurrente):** pacientes que presentan clínica progresiva desde el inicio del cuadro, pero que sufren brotes a lo largo de la enfermedad

Aunque esta es la clasificación establecida actualmente, en años previos se utilizó el término EM crónica progresiva (EMCP) para denominar a los pacientes que presentaban progresión de la enfermedad de forma independiente a la aparición de brotes clínicos. Es por este motivo que las formas clínicas de evolución EMSP, EMPP y EMPR no han sido estudiadas de forma independiente sino incluidas en un mismo grupo, el denominado EMCP. Sin embargo, actualmente, estudios de resonancia magnética (RM), en los cuales se ha investigado específicamente la forma EMPP, han demostrado que los pacientes con EMPP presentan menor número de lesiones y de

menor tamaño que la forma EMSP <sup>22,23,24</sup>, lo que sugiere que los mecanismos implicados en la forma clínica EMPP podrían ser distintos al resto de formas clínicas, por lo que debería ser considerado un grupo aparte. Los criterios para realizar el diagnóstico de EMPP han sido revisados recientemente <sup>25</sup>.

Los estudios que han comparado la evolución clínica de los pacientes con EM esporádica y EM familiar, así como la forma evolutiva de los pacientes de una misma familia, no muestran resultados concluyentes <sup>26,27,28,29</sup>.

FIGURA 1.1. Representación gráfica de las diferentes formas de evolución de la EM



## 1.5. ETIOPATOGENIA

Los numerosos estudios realizados sobre esta enfermedad sugieren que la EM estaría desencadenada por un agente infeccioso, probablemente un virus, que actuando sobre un individuo con una determinada susceptibilidad genética y en un ambiente apropiado, desencadenaría una respuesta autoinmune responsable de la lesión del SNC.

Revisaremos a continuación los estudios realizados que apoyan cada punto de esta hipótesis.

### 1.5.1. Virus

La hipótesis de que la EM tiene una etiología vírica parte de muy antiguo. Pierre Marie en 1884, fue el primero en proponer que un agente infeccioso era el responsable de causar la enfermedad. Se han sugerido varios mecanismos por los que los virus desencadenarían la enfermedad :1) infección aguda durante los primeros años de vida, que se continuaría con una inflamación crónica responsable de la afectación neurológica posterior ; 2) infecciones virales recurrentes que inducirían destrucción de la mielina de forma inespecífica ; 3) persistencia de un virus en el SNC.

Se han estudiado los títulos de anticuerpos frente a múltiples potenciales agentes infecciosos, y , por medio de técnicas de biología molecular, se ha investigado la presencia de secuencias víricas en células del SNC, células de sangre periférica y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM. Virus relacionados con la patogenia de la EM han sido, entre otros, el virus de Epstein-Barr(EBV), virus de la hepatitis B, Coronavirus, Paramyxovirus, virus JC y virus del sarampión.

En la tabla 1.2.<sup>30</sup> se recoge una selección de los estudios serológicos realizados en pacientes con EM.

En los últimos años se ha prestado especial atención al virus del herpes humano tipo 6 (HSV-6), por varias características que lo hacen un buen candidato como patógeno en la EM. En primer lugar, porque todos los virus herpes poseen la capacidad de permanecer latentes y persistir, y en segundo lugar, porque los virus herpes pueden

causar patología desmielinizante, y, tanto las reactivaciones de los virus herpes como las exacerbaciones de la EM, pueden ser desencadenadas por infecciones por otros virus <sup>31</sup> . Además el HVS-6 se ha asociado a meningitis <sup>32,33</sup> , encefalomielitis <sup>34</sup> y crisis febriles <sup>35</sup> .

En la tabla 1.3. <sup>36</sup> se describen resumidamente los diferentes estudios que apoyan el potencial papel de los virus herpes en la EM

También se han realizado estudios virológicos en los familiares de los pacientes EM y los resultados son discordantes. Unos autores hallan un aumento en la respuesta de anticuerpos contra ciertos virus en los pacientes EM comparado con sus hermanos sanos <sup>37</sup> o con sus hermanos gemelos <sup>38</sup> , mientras que otros no hallan diferencias significativas en gemelos discordantes para EM <sup>39,40</sup> .

TABLA 1.2. Resumen de los estudios serológicos realizados en EM <sup>30</sup>.

<b>Virus</b>	<b>Autor,año</b>	<b>Área de estudio</b>
Mayor frecuencia y/o mayores títulos de <i>Ac anti-sarampión en suero</i> de EM que en controles y/o hermanos sanos	Ammitzball y Clausen,1972 Panelius y col.,1973 Vandvik y Degré, 1975 Cremer y col.,1980 Madden y col,1981 Shirodaria y col.,1987	Copenhagen, Dinamarca Finlandia Oslo, Noruega California,USA USA Belfast, Reino Unido
Mayor frecuencia de <i>Ac anti-sarampión en LCR</i> de EM	Vandvik y Degré, 1975 Arnadottir, 1980	Oslo, Noruega Turku, Finlandia
Mayor frecuencia y/o mayores títulos de <i>Ac anti-rubeola</i> en pacientes EM que en controles y/o hermanos sanos	Cremer y col.,1980 Compston y col.,1986 Shirodaria y col.,1987	California,USA Reino Unido Belfast, Reino Unido
Mayor título de <i>Ac anti-virus de la parotiditis</i> en pacientes que controles	Berr y col.,1989 Alperovitch y col., 1991	Hautes-Pyrénées; Francia Hautes-Pyrénées; Francia
Mayor frecuencia y/o mayores títulos de <i>Ac anti-EBV</i> en pacientes	Bray y col., 1983 Shirodaria y col.,1987 Nyland y col.,1995	Salt Lake City UT,USA Belfast, Reino Unido Hordaland County, Noruega

TABLA 1.3. Estudios sobre virus herpes en EM <sup>36</sup>.

Ito y col.,1975	títulos séricos de Ac anti-virus varicela-zoster más elevados en 59 pacientes EM que en pacientes con otras enfermedades y controles sanos
Ferrante y col.,2000	presencia de RNAm y DNAdel HSV-1 en células mononucleares de sangre periférica en un número significativo de pacientes con EM aguda pero no en controles
Wandinger y col.,2000	reactivación del EBV durante las fases de actividad de la EM
Ferrante y col., 1997	ADN de EBV en sangre periférica de pacientes con EM
Ablashi y col., 1996	mayor frecuencia de Ac anti -HSV-6 en LCR y suero de pacientes EM
Challoner y col., 1995	secuencias de ADN de HSV-6 en cerebro de pacientes con EM ,y además, sobre todo asociadas a las placas, mientras que no las hallan en cerebro de controles sanos
Knox y col., 2000	infección activa (viremia) por HSV-6 en sangre de 22 de 41 pacientes y 0 de 61 controles normales (p<0.0001)
Berti y col., 2000	ADN de HSV-6 en suero de pacientes EM y no en controles sanos
Villoslada y col., 2002	mayor frecuencia y más elevados títulos séricos de Ac anti-HSV-6 en fases tempranas de EM (EMRR)que en fases tardías (EMSP)y que en controles

### 1.5.2. Factores ambientales

Diversos estudios epidemiológicos realizados describen una mayor incidencia de EM en zonas templadas del hemisferio norte y sur, y una baja prevalencia en zonas tropicales y subtropicales <sup>41</sup>. Concretamente, en Europa y en el norte de América se ha observado una incidencia mayor. Además, se ha demostrado una gran diferencia de prevalencia entre áreas de un mismo país, en poblaciones con similitud genética, teniendo que recurrir al clima, la dieta o a tóxicos industriales para explicar esta diferencia.

Con respecto a la dieta, se ha hallado asociación con la ingesta de grasa de origen animal, carne y productos de granja. La asociación con la industrialización parece más débil, y en particular se asociaría con fábricas de papel <sup>42</sup>.



Por otro lado, los estudios de migración han demostrado que si la migración se produce en edad temprana el riesgo de desarrollar la enfermedad será el del país de destino y si la migración se produce después de la etapa de adolescente, se conserva el riesgo del país de origen <sup>43,44</sup> .

### **1.5.3 Susceptibilidad Genética**

Aunque la idea de que los genes juegan un papel importante en la determinación del riesgo de padecer EM arrancó hace más de 100 años, es en los últimos 15 años cuando más evidencia se ha hallado de la existencia de una susceptibilidad genética.

Las tasas de prevalencia de la EM en la mayoría de las áreas en Europa son aproximadamente 0.5-1.0 por 1000, lo que puede traducirse en un riesgo en vida de 1 por cada 500-1000 habitantes. Puesto que el 20% de los pacientes tiene una historia familiar de al menos un caso adicional de EM <sup>45,46</sup>, no existe duda de que existe agregación familiar. Este hecho, naturalmente no constituye en sí mismo una evidencia de causa genética, puesto que las familias comparten el ambiente y estilo de vida. Sin embargo, analizando la concordancia de la EM con el grado decreciente de relación familiar y el índice de concordancia en hermanos gemelos, es posible concluir que, en verdad, los genes son, al menos en parte, responsables de la agregación <sup>45,46</sup>.

Hasta el momento, se han realizado 5 estudios en poblaciones amplias de gemelos de pacientes con EM (tabla 1.4.)<sup>47</sup>. La combinación de los resultados de estos estudios, demuestra que existe un índice de concordancia de cerca de un 26% para los gemelos homocigotos, comparado con sólo un 2.4% para parejas dicigotas de mismo sexo. Esta última cifra está cercana a la de hermanos no gemelos (no corregida por sexo). El riesgo de padecer EM es igual en parientes por adopción que en la población general <sup>48</sup>. En hermanastros, que sólo comparten uno de los progenitores, el riesgo no se ve influenciado por el hecho de si se han criado juntos <sup>49</sup>.

El análisis de los factores genéticos que operan en la EM se ha basado principalmente en estudios de asociación de genes candidatos, en los cuales, la

frecuencia de marcadores alélicos son comparados en pacientes y controles, y las diferencias analizadas estadísticamente.

La asociación de EM con genes localizados en la región MHC se conoce desde hace más de 20 años. En pacientes originarios del norte de Europa, la predisposición a desarrollar EM se ha asociado de forma consistente con los haplotipos DR15 y DQ6, que son la expresión fenotípica de los genotipos HLA-DRB1\*1501-DRB5\*0101 (DR15) y DQA1\*0102-DQB1\*0602 (DQ6). Sin embargo, la presencia de estos haplotipos no es suficiente ni indispensable para el desarrollo de EM. En los múltiples estudios de asociación HLA-EM se han descrito otras asociaciones, aunque todas con mucho menor potencia que el haplotipo DR15/DQ6. Entre esas otras, parece que puede tener alguna importancia el DR3 y DR4, este último en poblaciones del área mediterránea <sup>50</sup>.

En España, aunque estos estudios necesitan ser confirmados en muestras con mayor número de pacientes, las formas primariamente progresivas y las de peor pronóstico tienden a asociarse al DR4 y las formas benignas al DR2. La presencia de DR2 podría ser un marcador del desarrollo de EM tras una neuritis óptica <sup>51</sup>.

La asociación de EM con el HLA ejemplifica el paradigma de la función de los genes en autoinmunidad: susceptibilidad y progresión clínica son controladas por múltiples genes, cada uno con una influencia y penetración modesta, que ejercen su función en el contexto de influencias ambientales o agresiones microbianas.

Los estudios de ligamiento realizados hasta ahora sobre HLA-EM, en mucho menor número que los de asociación, han mostrado resultados contradictorios, aunque los más recientes también apuntan al ligamiento de la EM con el DR15 (DR2). Así p.e., el estudio de Oksenberg y col. <sup>52</sup> de 98 familias con EM, muestra ligamiento genético significativo y confirma la asociación específica con el HLA-DR2, pero, por otro lado, demuestra que un 25% de las familias investigadas, en su gran mayoría HLA-DR2 negativas, no muestran ligamiento al MHC, demostrando claramente la presencia de heterogeneidad genética en la enfermedad.

Los estudios genéticos en EM más recientemente realizados, tanto en EEUU, como en Canadá y Finlandia, buscando regiones cromosómicas como marcadores de susceptibilidad, han identificado diferentes regiones de interés que se especifican en la tabla 1.5. <sup>9</sup>

TABLA 1.4. Estudios de EM en gemelos <sup>47</sup>.

Autores	Concordancia monocigotos	Concordancia dicigotos
Heltberg y col.	4/19 (21.1%)	1/28 (3.6%)
Bobowick y col.	2/5 (40.0%)	0/4
Kinnunen y col.	2/7 (28.6%)	0/6
Sadovnick y col.	8/26 (30.8%)	2/43 (4.7%)
Mumford y col.	11/44 (25.0%)	2/61 (3.3%)
Totales	27/101 (26.7%)	5/142 (3.5%)

TABLA 1.5. Regiones cromosómicas candidatas en EM apoyadas por al menos dos estudios genéticos <sup>53</sup>.

Locus	Gen Candidato	RU	EEUU	CAN	FIN	ITA	SCAN
		(a)	(b)	(c)	(d,e,f)	(g)	(h,i,j,k,l,m)
<i>loci confirmados</i>							
6p21	HLA	+	+	+	+	+	+
<i>loci probables (apoyados por al menos 4 estudios)</i>							
2p11		+	+	+	-	+	-
5pter-cen		+	+	+	+	+	+
7pter-15		+	-	+	-	+	+
17q21-24	MPO	+	-	-	+	+	+
<i>loci sugestivos (apoyados por 3 estudios)</i>							
3p13-cen		-	+	+	-	-	+
2q33	CTLA4	-	-	+	+	+	(+)
<i>loci posibles (apoyados por dos estudios)</i>							
7q35	TCRb	-	+	-	-	(+)	+
11q21-23		-	-	+	+		
12p13	CD4	+	-	-	(+)	-	+
12q24	SCA2	(+)	+	-	-	-	+
14q32	IgHeavy	+	-	-	+	-	-
17pter-cen		+	-	-	-	(+)	(+)
19q13.1	APOC/E	+	+	(+)	-	-	-
22q13.1		+	-	-	-	+	-
Xq21		+	-	+		-	-

#### 1.5.4. Proceso patogénico

Es sabido, que la EM es una enfermedad inflamatoria crónica predominantemente de la sustancia blanca del SNC, que se caracteriza por la presencia de infiltrados focales de linfocitos T y macrófagos que conducen a la desmielinización, a lesión axonal de grado variable y a la pérdida de función neurológica<sup>54,5,6,7</sup>. La mayoría de los estudios apoyan la hipótesis de que es una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T CD4+ de tipo Th1 específicos frente a antígenos de la mielina. Estos linfocitos, una vez activados, atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE). Una vez en el SNC, la interacción del receptor de los linfocitos T (TCR) con los antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos (CPA)(macrófagos y posiblemente también astrocitos y microglía del SNC) a través de las moléculas del MHC de clase II (en humanos HLA-clase II), induce su activación, producción y secreción de citocinas, que a su vez, activa a otros macrófagos y linfocitos B. Como consecuencia de esta reacción inmunológica se produce la destrucción de la mielina, aunque el mecanismo preciso por el que se produce el daño no se conoce. También puede existir remielinización aunque de forma incompleta.

Una vez desencadenada la respuesta autoinmune la cadena de acontecimientos y los elementos que intervienen son básicamente los mismos que en cualquier tipo de respuesta inflamatoria autoinmune, aunque con las peculiaridades propias del órgano diana, el SNC, y la existencia de la BHE. A este respecto, uno de los factores limitantes en la inflamación del SNC es anatómico, la BHE, la cual restringe el acceso hacia el SNC de células y macromoléculas. La rotura de la BHE es un punto importante en la patogenia de la EM, aunque no está claro si se trata de un hecho primario o secundario al proceso inflamatorio. En este sentido se sabe que las células T activadas son capaces de atravesar la BHE intacta. Además, se cree que estas células T activadas sólo permanecen en el SNC si reconocen antígenos del SNC<sup>55</sup>.

#### 1.5.4.1. Inicio de la respuesta autoinmune

El papel central de los linfocitos T, tanto regulador como efector de la autoinmunidad, los convierte en los principales candidatos para iniciar la cadena de acontecimientos que desencadenarán la enfermedad. Se ha observado que en la encefalitis alérgica experimental (EAE) se puede transferir la enfermedad de un animal a otro tras la inmunización con linfocitos T activados frente a antígenos de la mielina <sup>56</sup>. En pacientes con EM algunos autores han observado que linfocitos T reactivos frente a antígenos de la mielina están presentes en mayor grado que en los controles <sup>57,58</sup>, y que las subpoblaciones de linfocitos T (colaboradores y supresores) fluctúan en el curso clínico de la enfermedad <sup>59</sup>. La existencia de activación celular se observa por los niveles altos de citocinas en el suero y LCR de los pacientes con EM <sup>60</sup>. Aunque el mecanismo exacto de la activación inicial de las células T autorreactivas y su reactivación durante los brotes clínicos se desconoce, sí parece que dicha activación ocurre fuera del SNC <sup>5</sup>. También hay autores que defienden la idea de que debe haber una alteración primaria de la neurona para que se desarrolle la EM, con lo cual la respuesta inmune se iniciaría dentro del SNC <sup>61</sup>. Se han postulado al respecto muchos mecanismos, que se comentan a continuación, aunque ninguno responde a todas las preguntas.

1. Un posible mecanismo para la activación de las células T autorreactivas sería el llamado "mimetismo molecular" que ocurriría en el transcurso de una infección viral o bacteriana. Existen muchas evidencias de reacciones cruzadas entre patógenos y componentes propios <sup>62</sup>.
2. Otra posibilidad es que se produzca por la presencia de 2 TCR distintos en el mismo linfocito T <sup>63,64,65</sup>. Si uno de estos receptores fuera específico de un autoantígeno, podría producirse una reacción autoinmune cuando el otro receptor reconociera su antígeno (por ejemplo un antígeno bacteriano en el transcurso de una infección).

3. Otro mecanismo posible para activar células T autorreactivas vendría desencadenado por superantígenos. Los superantígenos son antígenos virales o bacterianos capaces de estimular poblaciones completas de células T por unión a la cadena V $\beta$  del TCR y a moléculas HLA-II de las CPA induciendo la activación de ambos tipos celulares <sup>66,67</sup>. Se ha calculado que pueden activar hasta un 30% de linfocitos T (en comparación con el 0,01-0,001% de células activadas por antígenos convencionales).
4. Por último, a parte de la activación por mimetismo molecular, o por expresión dual del TCR o por superantígenos, las células T autorreactivas también pueden ser estimuladas por mecanismos inespecíficos como la exposición a concentraciones elevadas de citocinas secretadas en el transcurso de reacciones inflamatorias.

Existen resultados experimentales en los que se muestran evidencias que apoyan cada uno de estos mecanismos. Es posible, que en muchos casos sean más de uno de estos mecanismos los que operen de forma simultánea.

#### **1.5.4.2. Paso de los linfocitos T activados al SNC**

Dado que la migración transendotelial de los linfocitos T activados a través de la BHE es un paso crucial en la patogenia de la EM, se ha estudiado con mucho interés el papel de las diferentes moléculas que intervienen en él (Figura 1.2.).

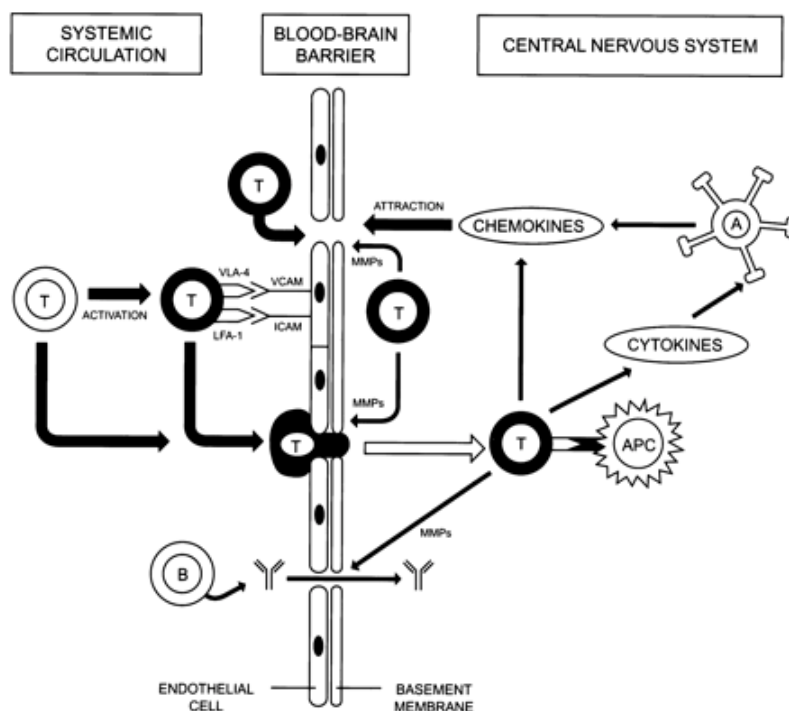
Inicialmente, actúan unas moléculas denominadas moléculas de adhesión, que intervienen en la interacción entre los linfocitos y el endotelio vascular. Las primeras en jugar un papel en dicha interacción son las selectinas que favorecen que los linfocitos "rueden" sobre el endotelio y se unan al mismo. Después, la interacción de las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas junto con las integrinas refuerza la adhesión que se había establecido en el paso anterior. Para nuestro trabajo de investigación en la EM familiar hemos elegido el estudio de la L-selectina y

el VLA-4, basándonos en su papel patogénico demostrado en los estudios en la EAE, como veremos más adelante <sup>68,69</sup>.

A continuación los linfocitos migran a través de la matriz extracelular formada mayoritariamente por colágeno de tipo IV. La producción de enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas, favorece este proceso <sup>70</sup>.

Los linfocitos T activados se dirigen al lugar de la inflamación a través de un gradiente de concentración de moléculas quimiotácticas, llamadas quimiocinas (QC), que, se sabe, son producidas de forma abundante en lesiones cerebrales inflamatorias. La fuente de QC en las lesiones cerebrales son los macrófagos, la microglía y los astrocitos <sup>71</sup>. Las QC parecen tener un papel principal en el reclutamiento selectivo de ciertos tipos de células inflamatorias y se cree que son importantes para guiar las células inflamatorias desde el espacio perivascular hasta el parénquima cerebral <sup>72</sup>. Recientemente se ha descrito que algunas de las interacciones entre las QC y sus receptores podrían jugar un papel importante en la patogénia de la EM <sup>73,74</sup>.

FIGURA 1.2. Esquema del inicio, entrada y posterior reclutamiento de células inmunes hacia el SNC (Wingerchuk DM, 2001)<sup>75</sup>



### 1.5.4.3. Inflamación y desmielinización

Una vez los linfocitos activados entran en el SNC a través de la BHE, se produce la interacción del TCR con los antígenos presentados por las CPA (macrófagos y posiblemente también astrocitos y microglía del SNC) a través de las moléculas de MHC de clase II <sup>76,77</sup> iniciándose el proceso inflamatorio favorecido por el aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras <sup>78</sup> y factores solubles como citocinas (CC) que, a su vez, activan a macrófagos y linfocitos B <sup>79</sup> (Figura 1.3.).

Por lo que respecta a los mecanismos de desmielinización se postulan diferentes hipótesis sobre cómo se produce la destrucción de las vainas de mielina y de los oligodendrocitos.

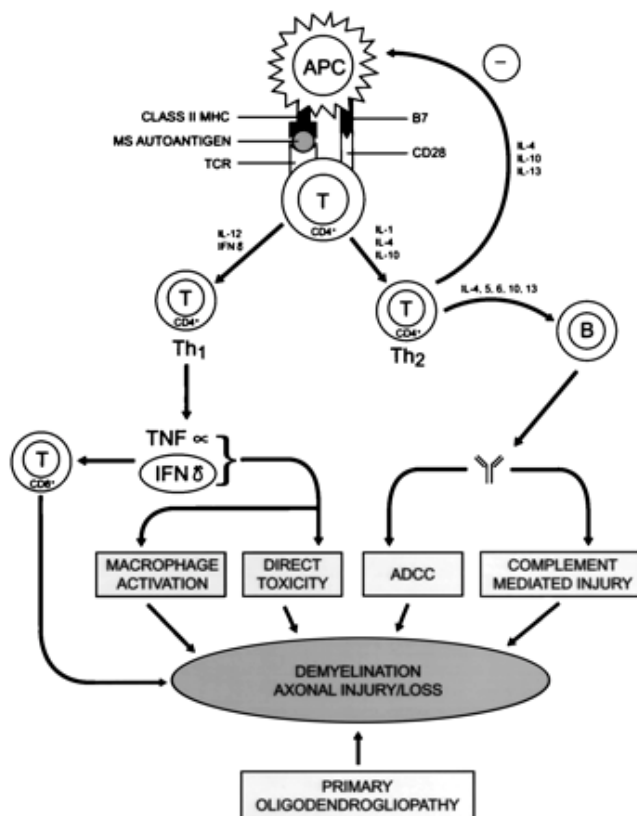
1. Uno de los mecanismos de lesión del oligodendrocito sería la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Las células B penetran en el SNC a través de la BHE dañada en estadios tempranos de la enfermedad. La ruptura de la BHE también permite la circulación de anticuerpos al SNC. El análisis de las lesiones de EM han probado la presencia de anticuerpos dirigidos contra la PMB, la proteína proteolipídica (PLP) y la glicoproteína mielínica del oligodendrocito (MOG) <sup>80</sup>. También se ha sugerido que los anticuerpos anti-galactocerebrósido pueden inducir un aumento del calcio intracelular, produciendo una desestructuración de microtúbulos dentro de la mielina y la consiguiente destrucción de ésta <sup>81</sup>. Por otro lado, los anticuerpos también pueden inducir activación del complemento. En cultivos de microglía y oligodendrocitos se ha observado que la adición de complemento estimula la fagocitosis por la microglía activada <sup>82</sup>.
2. Por otra parte, también podrían existir mecanismos de citotoxicidad directa como los mediados por linfocitos T CD8+, células T  $\gamma$ - $\delta$  o por células *natural killer* (NK). Estas células están presentes en las lesiones de EM y podrían ser responsables de la lisis directa a los oligodendrocitos <sup>83,84,85</sup>.



3. La desmielinización puede ocurrir también como un efecto secundario del daño inducido por factores solubles como, por ejemplo, el TNF- $\alpha$  liberado por las células T activadas y macrófagos, que se encuentra en concentraciones elevadas en los infiltrados inflamatorios <sup>86</sup>. Los linfocitos T activados también producen TNF- $\beta$  que induce apoptosis en cultivos de oligodendrocitos y se han encontrado concentraciones elevadas en las lesiones de EM. Este podría ser otro factor capaz de producir el daño de la mielina <sup>87</sup>. Otro grupo de factores solubles liberados por linfocitos T citotóxicos son las perforinas, que mediante la producción de poros en la membrana del oligodendrocito inducen un aumento del calcio intracelular y apoptosis de las células <sup>88</sup>. Además, como parte del proceso inflamatorio, se liberan muchas proteasas, radicales libres, óxido nítrico, y otras citocinas. Muchos de ellos han demostrado su toxicidad directa en oligodendrocitos de cultivo <sup>89,90,91</sup>.

Por otro lado, la inflamación del SNC puede causar bloqueo de la conducción dando lugar a síntomas agudos de EM y sin producir una desmielinización permanente. Aunque, probablemente, la pérdida final de mielina y el fracaso de una remielinización completa explica los síntomas persistentes de la EM, una inflamación local puede ser suficiente, al menos temporalmente, para alterar la función de la neurona. Por lo tanto, la desmielinización o la muerte de los oligodendrocitos no son requerimientos obligados para la producción de síntomas.

FIGURA 1.3. Esquema de la activación de la célula T inducida por autoantígeno y desarrollo del proceso que conduce a la desmielinización y daño axonal. ADCC (antibody-mediated, cell-mediated toxicity) (Wingerchuk DM, 2001)<sup>75</sup>.



## 1.6. QUIMIOCINAS y RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

### 1.6.1. Concepto y características

Las **quimiocinas (QC)**, son péptidos quimiotácticos solubles de bajo peso molecular, liberados por diferentes tipos celulares como respuesta a un daño tisular u otros estímulos.

Se dividen en cuatro subfamilias distintas: CXC, CC, C y CX<sub>3</sub>C, en base a la posición de las dos primeras cisteínas en el extremo N-terminal así como a consideraciones genéticas y funcionales. Menos frecuentemente estos grupos son designados por las letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  respectivamente <sup>92</sup>.

Se conocen más de 40 QC distintas <sup>92</sup>. Los miembros de la familia CXC que contienen un motivo glutamato-leucina-arginina (ELR) cercano al N-terminal que se une al receptor, son primariamente quimiotácticas para los neutrófilos y células endoteliales. Las QC CXC que carecen de este motivo (CXC no ELR) son quimioatrayentes para las células T activadas y bloquean los efectos angiogénicos de los miembros de familias portadoras de ELR. Los miembros de la familia CC son primariamente quimiotácticas para los monocitos/macrófagos, linfocitos T, basófilos, y eosinófilos. La familia C contiene un miembro, la linfotactina, que es quimiotáctica para las células T y NK. El único miembro de la familia CX<sub>3</sub>C (CX<sub>3</sub>CL1/neurotactina/fractalkina) consiste en un dominio de QC unido a un tallo de mucina. Aunque los miembros de las subfamilias de QC muestran una considerable especificidad quimioatrayente para las subpoblaciones de leucocitos, se dan muchas excepciones <sup>93</sup>. En la tabla 1.6. figuran las quimiocinas descritas hasta el momento con la nomenclatura oficial actual y otras designaciones con las que también son conocidas. En **negrita** aparecen las designaciones que utilizaremos a lo largo del texto.

La acción de las QC está mediada por una familia de receptores de QC, de los que actualmente se conocen 20 diferentes (Tabla 1.6.) <sup>92,94,95</sup>. Aunque la mayoría de receptores reconocen más de una QC, muestran casi siempre una restricción para una única subclase de las mismas. Así, el método de nomenclatura viene determinado por la

especificidad de subclase de QC que tiene el receptor. Entre los 5 receptores que se unen a las QC CXC están los receptores CXCR1 a CXCR6, y la familia de receptores que se unen a las QC CC incluyen del CCR1 al CCR10. Recientemente, se han identificado receptores para fractalquina (CX<sub>3</sub>CR1) y linfotactina (XCR1). A este último se le ha incluido una X en su designación para diferenciarlos del receptor de complemento 1 (CR1). Otros dos receptores, descritos en los últimos años son el D6 y el receptor de antígeno Duffy para QC, DARC, que ha demostrado unirse tanto a las QC CXC como CC <sup>95</sup>.

Datos recientes sugieren una expresión selectiva de receptores de QC según se trate de células Th1 y Th2. En concreto, las clonas humanas de Th1 expresan CXCR3 (receptor para IP-10 y Mig) y CCR5 (receptor para MIP-1alfa, MIP-1 beta, y RANTES), mientras que las Th2 expresan CCR3 (receptor para eotaxina, RANTES, MCP-3, MCP-4), CCR4 (receptor para TARC y MDC) y CCR8 (receptor para I-309) <sup>96,97</sup>.

TABLA 1.6. Quimiocinas y sus receptores (Murphy y col., 2000<sup>92</sup>; Murphy y col., 2002<sup>94</sup>; Murdoch y col.2000<sup>95</sup>)

QUIMIOCINAS		RECEPTORES DE QUIMIOCINAS	
NOMBRE oficial	SINÓNIMOS	RECEPTORES	AGONISTAS PRINCIPALES
<b>CXC(α)</b>		<b>CXC</b>	
CXCL1	GROα; MGSA; MIP-2 <sup>a</sup> (mouse); N51/KC <sup>9</sup> (mouse)	CXCR1	CXCL8
CXCL2	Groβ, <b>MIP-2α</b>	CXCR2	CXCL1-3, CXCL5-8
CXCL3	Groy, <b>MIP-2β</b>	CXCR3	CXCL9-11
CXCL4	Platelet factor-4	CXCR4	CXCL12
CXCL5	ENA-78	CXCR5	CXCL13
CXCL6	GCP-2	CXCR6	CXCL16
CXCL7	PBP→CTAP-III→β-TG→NAP-2 <sup>b</sup>		
CXCL8	IL-8	<b>CC</b>	
CXCL9	<b>Mig</b>	CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13-16, CCL23
CXCL10	<b>γIP-10</b> ; CRG-2 (mouse)	CCR2	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13
CXCL11	I-TAC; β-R1 <sup>c</sup> ; IP9; H174	CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28
CXCL12	SDF-1α; SDF-1β <sup>d</sup> ; PBSF	CCR4	CCL17, CCL22
CXCL13	BCA-1; BLC	CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL14
CXCL14	BRAK; bolequine	CCR6	CCL20
CXCL15		CCR7	CCL19, CCL21
CXCL16		CCR8	CCL1, CCL4, CCL17
		CCR9	CCL25
		CCR10	CCL26-28
<b>CC(β)</b>		<b>CX<sub>3</sub>CYC</b>	
CCL1	<b>I-309</b> ; TCA-3(mouse)	CX <sub>3</sub> CR1	CX3CL1
CCL2	<b>MCP-1</b> ; MCAF; JE (mouse)	XCR1	XCL1-2
CCL3	<b>MIP-1α</b> ; MIP-1αS, LD78α <sup>e</sup>		
NA	LD78β; MIP-1αP	<b>Chemokine binding protein</b>	
CCL4	<b>MIP-1β</b>	Duffy	CCL2, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CXCL1, CXCL8
CCL5	<b>RANTES</b>	D6	CCL2, CCL7
CCL6	C10 (mouse); MRP-1(mouse)		
CCL7	<b>MCP-3</b>		
CCL8	<b>MCP-2</b>		
CCL9	MRP-2 (mouse); MIP-1γ (mouse)		
CCL10			
CCL11	<b>Eotaxin</b>		
CCL12	MCP-5 (mouse)		
CCL13	<b>MCP-4</b>		
CCL14	CC-1; HCC-1; NCC-2; CCCK-1/CCCK-3; Ckβ1; MCIF		
CCL15	HCC-2; leukotactin-1(Lkn-1); MIP-5; CC-2; NCC-3; MIP-1δ		
CCL16	HCC-4; LEC; NCC-4; LMC; monotactin-1(Mtn-1); LCC-1; ILINCK		
CCL17	<b>TARC</b>		
CCL18	DC-CK-1; PARC; MIP-4; AMAC-1; ckβ7		
CCL19	MIP-3β; ELC; exodus-3; ckβ11		
CCL20	MIP-3α; LARC; exodus-1; ST38		
CCL21	6Ckine, SCL; exodus-2; TCA4; ckβ9		
CCL22	MDC; dc/β-ck; STCP-1(mouse) abcd-1		
CCL23	MPIF-1; MIP-3; ckβ8-1		
CCL24	MPIF-2; eotaxin-2; ckβ7		
CCL25	TECK; ckβ15		
CCL26	Eotaxin-3; MIP-4α		
CCL27	ESkine; CTACK; ILC; ALP(mouse); skinkine		
CCL28	MEC		
<b>C</b>			
XCL1	Lymphotactin α; SCM-1α; ATAC		
XCL2	Lymphotactin β; SCM-1β; ATAC		
<b>CX3C</b>			
CX3CL1	Fractalkine; neurotactin (mouse)		

### **1.6.2. Producción de quimiocinas por células T encefalíticas**

A pesar de la especificidad de antígeno, las células T activadas pueden entrar en el espacio perivascular del SNC; sin embargo, sólo las células T específicas para antígeno de tejido, permanecen <sup>98</sup>.

Existen diferentes mecanismos posibles, y no excluyentes entre si, por los que las células T Ag-específicas podrían dirigir el reclutamiento de células inflamatorias hacia el SNC. La primera sería que células T neuroantígeno-específicas entran en el espacio perivascular intratecal, y reclutan células T Ag-específicas y no Ag-específicas, y macrófagos adicionales, mediante la secreción de QC en el órgano diana del SNC. Kuchroo y col.<sup>99</sup> demostraron que las células T encefalíticas aumentan la secreción de CC proinflamatorias y QC, incluidas la MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , cuando son reestimuladas in vitro. Godiska y col. <sup>100</sup> también comprobaron que las células T encefalíticas podían aumentar la secreción de QC a través de estimulación antigénica.

Un segundo mecanismo indirecto por el cual las células T encefalíticas inducen la acumulación de leucocitos en el SNC , implicaría la inducción de la expresión de QC en elementos celulares asociados al sistema vascular cerebral y BHE. Estas células incluirían los astrocitos, macrófagos perivascuales , y pericitos así como células endoteliales y musculares lisas. Todas estas células pueden segregar QC in vitro tras estímulos inflamatorios apropiados<sup>93</sup>.

### **1.6.3. Quimiocinas y receptores de quimiocinas en la EAE**

Hulkower y col. <sup>101</sup> fueron los primeros en demostrar la relación entre la expresión de QC y la EAE aguda.

En la EAE, tras el inicial reconocimiento mediado por células T del antígeno, las QC reclutan numerosos tipos celulares hacia el SNC, que incluyen neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. También juegan un papel en la coestimulación de los linfocitos T, e influyen en la diferenciación de las células T y producción de CC por estas células. Además, las QC alteran la adhesión de los leucocitos circulantes a la

pared vascular promoviendo una adhesión más firme entre las integrinas de la superficie de los leucocitos y las moléculas de adhesión de la superficie de las células endoteliales.

Godiska y col.<sup>100</sup> demostraron la expresión en el SNC de ARNm de QC (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TCA-3, IP-10, MCP-1, y factor derivado de la célula del estroma) antes del inicio clínico de la enfermedad y demostraron que los niveles se mantenían elevados a lo largo del curso de la enfermedad clínica aguda. Miyagishi y col.<sup>102</sup> también hallaron en la EAE un marcado aumento de la expresión de RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  en las células inflamatorias del SNC coincidiendo con la aparición de síntomas clínicos. Karpus y col.<sup>103</sup> comprobaron que es la MIP-1 $\alpha$  la QC que más estrechamente se relaciona con el debut de la EAE aguda, mientras que la MCP-1 se correlaciona con el desarrollo de la EAE recidivante. Estos autores demostraron la importancia biológica de las QC, hallando que la administración de AC anti-MIP-1 $\alpha$  inhibe el desarrollo de la EAE aguda, mientras que los anti-MCP-1 reducen significativamente la severidad de la EAE recidivante<sup>104</sup>. Otro hallazgo que demuestra la importancia, en este caso, de los receptores de QC en la EAE, es que los ratones CCR1 negativos sufren una forma menos severa de EAE<sup>105</sup> y los ratones CCR2 negativos son resistentes al desarrollo de la EAE<sup>106,107</sup>.

#### **1.6.4. Quimiocinas en la EM**

El papel de las QC en la patogenia de la EM aún no ha sido bien establecida. Se ha estudiado la expresión de las QC y sus receptores en LCR y sangre periférica, y en tejido cerebral de pacientes con EM.

##### **1.6.4.1. LCR**

Diferentes investigadores han comprobado una variación en los niveles o expresión celular de las quimiocinas o de sus receptores en LCR de pacientes EM en fase activa.

Miyagishi y col.<sup>108</sup> demostraron una elevada expresión de MIP-1alfa en el LCR de pacientes con EM en brote comparado con pacientes control con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias, y los niveles elevados se correlacionaban con recuentos elevados de leucocitos y elevación de las proteínas en LCR.

Sorensen y col.<sup>73</sup> hallaron un aumento de los niveles de RANTES y un aumento en tres veces de la IP-10 en el LCR de pacientes EM comparado con controles. Los niveles de IP-10 también se correlacionaron con recuentos de leucocitos aumentados en LCR. En dos estudios muy recientes, Mahad y col.<sup>109</sup> y Scarpini y col.<sup>110</sup>, confirmaron los niveles superiores de IP-10 en LCR de pacientes EM en brote, y, por otro lado, comprobaron una disminución de los niveles de MCP-1. Tanto Sorensen y col.<sup>73</sup> como Mahad y col.<sup>109</sup> demostraron correlación entre los niveles de IP-10 y la expresión de su receptor CXCR3 en las células CD4+ en LCR.

#### **1.6.4.2. Sangre periférica**

Se ha demostrado un aumento de linfocitos que expresan CCR5 en sangre periférica de pacientes con EM activa<sup>111,73,112</sup> y no activa<sup>113</sup>, y un aumento de CXCR3 en pacientes con EMRR en fase de remisión tanto en linfocitos<sup>111</sup> como en monocitos<sup>113</sup>. Sorensen y col.<sup>114</sup> han comprobado recientemente la disminución de la expresión de CXCR3 con el tratamiento con interferón -beta 1a.

Iarlori y col.<sup>115</sup> hallaron que la producción de RANTES estaba aumentada en la EMRR en brote comparado con controles y que el tratamiento con IFN-beta reducía la producción, tanto en fase de brote como de remisión..

#### **1.6.4.3. Tejido cerebral**

Recientes hallazgos en la EM apoyan la importancia de la distribución tisular de las QC, como se ha demostrado en la EAE<sup>93</sup>.

McManus y col.<sup>161</sup> hallaron en estudios post-mortem de tejido cerebral de pacientes EM una mayor expresión de MCP-1,-2 y -3 hacia el centro de lesiones agudas y crónicas; en las lesiones más crónicas la expresión de estas moléculas estaba considerablemente disminuida y no hallaron expresión en cerebros de controles



normales. Otros estudios post-mortem han demostrado una elevada expresión de otras QC (RANTES, MIP-1 alfa, IP-10 y proteína Mig), así como de sus receptores (CCR5 y CXCR3) en las lesiones desmielinizantes de pacientes con EM, tanto en astrocitos como en los linfocitos T infiltrantes <sup>117,77,111,118,119</sup>.

En conclusión, no está claro el grado en que las QC y sus receptores contribuyen a la patogenia de la EM, pero todos los datos juntos sugieren que las vías IP-10/CXCR3 y RANTES/CCR5, juegan un papel importante en la patogenia de la EM.

## **1.7. MOLECULAS DE ADHESION**

### **1.7.1 Concepto y Clasificación**

Las moléculas de adhesión (MA) son glicoproteínas expresadas en la superficie celular. Su interacción con sus ligandos media la adherencia de los leucocitos a otras células, endotelio vascular, o matriz extracelular. Regulan la circulación de los leucocitos, el reclutamiento de células linfoides hacia los tejidos y lugares de inflamación, y la migración transendotelial.

Desde el punto de vista estructural se dividen en tres clases (Tabla 1.7.):

1-selectinas

2-integrinas

3-miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas

### **1.7.2. Características**

#### **1.7.2.1 Selectinas**

Las selectinas están expresadas en los leucocitos, plaquetas y células endoteliales, y su componente estructural común es el dominio amino-terminal de tipo lectina calcio-dependiente. Las selectinas han sido subclasificadas de acuerdo al tipo celular en el que fueron originariamente identificadas: L-selectina (linfocitos), P-selectina (plaquetas/endotelio), y E-selectina (endotelio). A través de su unión mediante rápidas asociaciones y disociaciones a ligandos glicosilados y sializados, las selectinas median el "rodar" de los leucocitos sobre la pared celular endotelial y están implicadas en la localización inicial de los leucocitos en los lugares de inflamación. El rodar de los leucocitos los expone a la acción de las QC y CC. Esta exposición conduce a la activación leucocítica, regulación al alza de MA adicionales, diapedesis/quimiotaxis, y localización prolongada de las células en el lugar de la inflamación.

TABLA 1.7. Moléculas de adhesión y sus ligandos (McMurray RW, 1996 <sup>120</sup>)

<i>Nombre</i>	<i>Sinónimo(CD=cluster designation)</i>	<i>Ligando</i>	<i>Lugar de expresión</i>
<b><u>Selectinas</u></b>			
L-Selectina	LAM-1; Mel-14 (CD62L)	mol.mucine-like glicosiladas; Glycam-1CD34, MadCAM-1	T, Mo, Ma, PMN
E-Selectina	ELAM-1(CD62E)	moléculas mucine-like sializadas	E
P-Selectina	GMP-140(CD62P); PADGEM	ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1)	P, E
<b><u>Integrinas</u></b>			
<b><u>Integrinas <math>\beta</math>1</u></b>			
$\alpha$ 4 $\beta$ 1	VLA-4(CD49d/CD29)	VCAM, FN(CS-1),PP-HEV	B, T, Ma
$\alpha$ 5 $\beta$ 1	VLA-5(CD49e/CD29)	FN(RGD)	T, E, P
$\alpha$ 6 $\beta$ 1	VLA-6(CD49f/CD29)	LM	T, P
<b><u>Integrinas <math>\beta</math>2</u></b>			
$\alpha$ L $\beta$ 2	LFA-1(CD11a/Cd18)	ICAM-1,-2,-3	L, Ma, Mi
$\alpha$ M $\beta$ 2	MAC-1; CR3(CD11b/CD18)	ICAM-1,C3bi,FN,FX	Mo,N
$\alpha$ X $\beta$ 2	p150,95; receptor CR14	ICAM-1,FN, C3bi	Mo
<b><u>Otras integrinas</u></b>			
$\alpha$ 4 $\beta$ 7	LPAM-1(CD49d/CD104)	MadCAM-1,VCAM	B y T
<b><u>Superfamilia de las Igs</u></b>			
ICAM-1	CD54	$\alpha$ L $\beta$ 2, $\alpha$ M $\beta$ 2	todas
ICAM-2	CD102	$\alpha$ L $\beta$ 2	E
VCAM-1	CD106	$\alpha$ 4 $\beta$ 1	E
PECAM-1	CD31	$\alpha$ V $\beta$ 3	E,T(nativas),NK,Ma
LFA-2	CD2	LFA-3	T, NK
LFA-3	CD58	LFA-2	E,T y B, Ma, Mi
CD28:1		B7-1,B7-2	T(reposo y activadas)
CTLA-4	CD152	B7-1, B7-2	T(activadas)
B7-1	CD80	CTLA-4,CD28	T y B, Ma Mi,A
B7-2	CD86	CTLA-4,CD28	T y B, Ma, Mi,A
<b><u>Otras</u></b>			
CD40		CD154(CD40L)	B, Ma, E
CD40L	CD154	CD40	T(activada), Ma
CD44		ECM	T, B, Ma, A, O
MAdCAM-1		VLA-4, LPAM-1	HEV

ABREVIATURAS: L=leucocitos, HEV=vénulas endoteliales, A=astrocitos, E=endotelio, Ma=macrófagos, Mi=microglía, O=oligodendrocitos, T=células T, B=células B, NK=céls natural killer, P=plaquetas, PMN=polimorfonucleares

La L-selectina está expresada en todos los leucocitos y juega un papel crucial en la adhesión de los linfocitos a las células de los ganglios linfáticos periféricos y endotelio activado. La adhesión de la selectina típicamente precede a la adhesión firme y emigración, acciones mediadas por interacciones con integrinas y superfamilia de Igs. La L-selectina se pierde rápidamente de la superficie de los leucocitos tras la activación.

La P-selectina que se halla en las plaquetas y en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, une los neutrófilos polimorfonucleares al endotelio, actúa de forma sinérgica con las CC para regular al alza la expresión de integrinas leucocitarias, y proporciona la adhesión inicial en los focos inflamatorios.

La E-selectina, expresada en el endotelio, es regulada al alza a las 4-6 horas tras la exposición a la interleucina-1 (IL-1) o TNF- $\alpha$ , y se desprende rápidamente tras ceder la estimulación por citocinas. La unión de los leucocitos por la E-selectina conduce a una adherencia más estable por los receptores de integrina.

La importancia fisiológica de las selectinas en las respuestas inflamatorias se puede comprobar en la deficiencia de adhesión leucocítica tipo II, en la que la carencia congénita de ligandos de selectina produce defectos de adhesión significativos y graves infecciones recurrentes <sup>120</sup>.

### **1.7.2.2 Integrinas**

Las integrinas son estructuras heterodiméricas compuestas por subunidades alfa y beta unidas por unión no covalente. Combinaciones de las subunidades forman receptores funcionalmente diferentes. El nombre integrina se basó en la función de estas moléculas transmembrana de "integrar" información extracelular en el citoesqueleto. Las integrinas son identificadas mediante nombres descriptivos (p.e. antígeno de función linfocítica -1 o LFA-1), nombre de la composición del heterodímero (p.e. alfa1beta2), o designación numérica acumulada (cluster designation -CD) de la combinación heterodimérica (p.e. alfa 1beta2 es CD11a/CD18). Las integrinas se unen a una variedad de proteínas de la matriz extracelular (p.e. fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno, factor de Von Willebrand, factor X, fibrinógeno) y a receptores de la superfamilia de Igs.. Un ligando de la matriz extracelular común a muchas integrinas es la secuencia amino arginina-lisina-aspartato (abreviada RGD), que se halla en la

fibronectina. Esta unión de las integrinas a péptidos de la matriz extracelular ha sido muy aprovechado en las investigaciones utilizando péptidos sintéticos para inhibir competitivamente la unión de leucocitos en modelos animales de enfermedad inflamatoria.

El LFA-1 y el very late antígeno -4 (VLA-4) son las integrinas prototipo. La LFA-1, es una beta-2 integrina, expresada en la mayoría de leucocitos circulantes, que se une a los receptores de la superfamilia de Igs, la molécula de adhesión intercelular-1 y 2 (ICAM-1 e ICAM-2), actúa como molécula coestimuladora en la activación de los linfocitos T, y participa en la regulación de la apoptosis de las células B. El LFA-1 está sobrexpresado en los linfocitos T memoria. El VLA-4, una beta-1 integrina, también se encuentra en los leucocitos activados (linfocitos y monocitos), se adhiere a la fibronectina a través de su segmento conector CS-1 y al endotelio vascular a través de la molécula de adhesión celular vascular -1 (VCAM-1). La expresión de VLA-4 parece ser determinante para la migración de los linfocitos hacia el tejido inflamado. Otras beta-1 integrinas como el VLA-5 (alfa5beta1; CD49e/CD29) y el VLA-6 (alfa6beta1; CD49f/CD29) también están reguladas al alza en las células T activadas y forman interacciones adhesivas significativas durante las respuestas inflamatorias, pero sus funciones específicas están aún por definir.

La función fisiológica de las integrinas en las respuestas inflamatorias queda reflejada en la deficiencia de adhesión leucocítica tipo I, enfermedad de herencia recesiva. Defectos en los genes de la integrina  $\beta 2$  conllevan la ausencia de expresión de la integrina en los leucocitos, lo que resulta en déficits de adhesión severos, que predisponen al paciente a infecciones bacterianas graves<sup>120</sup>.

### **1.7.2.3. Superfamilia de las Inmunoglobulinas**

Las superfamilia de las Igs son denominadas y clasificadas conjuntamente, porque cada receptor tiene dominios aminoácidos de tipo inmunoglobulina. Incluyen diferentes proteínas de la superficie celular halladas en células inmunocompetentes: CD4, CD8, complejo receptor de célula T/CD3, y moléculas MHC de clase I y II. Las proteínas que funcionan como moléculas de adhesión son el LFA-2 (CD2), LFA-3, ICAM-1, ICAM-2, y VCAM-1. El ICAM-1 y VCAM-1 son los principales receptores

de LFA-1 y VLA-4 respectivamente. La expresión de ICAM-1 puede ser inducida en una gran variedad de células. La estimulación por CC de las células endoteliales incrementa la adhesión de los leucocitos principalmente a través del aumento de la expresión de ICAM-1, que promueve la adhesión de los leucocitos LFA-1 positivos a los lugares de inflamación. La expresión de VCAM-1 también se observa en una amplia variedad de tipos celulares. La adhesión VLA-4/VCAM-1 es principalmente responsable de la adhesión celular prolongada en los lugares de inflamación. Los AcMo dirigidos contra componentes de las interacciones LFA-1/ICAM-1 o VLA-4/VCAM-1 inhiben la respuesta inflamatoria en modelos animales.

En resumen, las selectinas, integrinas y receptores de IGSF están expresadas por una gran variedad de células. Los cambios en su expresión celular modulan la iniciación, progresión y severidad de la inflamación. La regulación de la adhesión es crucial en la patogenia de la respuesta inflamatoria en la enfermedad autoinmune<sup>120</sup>.

### **1.7.3. Moléculas de adhesión y EAE**

El estudio de la migración transendotelial en el modelo animal de EM, la EAE, ha sido muy útil para caracterizar el papel patogénico de las MA y sus posibles aplicaciones terapéuticas.

Se ha visto que la interacción inicial de las selectinas con el endotelio vascular es muy importante para el desarrollo de la EAE. La administración de anticuerpos contra la L-selectina inhibe esta enfermedad<sup>68</sup>, y ratones PMB-TCR transgénicos que carecen de L-selectina no desarrollan EAE antígeno-inducida<sup>121</sup>.

Por otro lado, la interacción VLA4/VCAM-1, implicada en el reclutamiento de linfocitos a las zonas donde hay inflamación, también ha sido muy bien estudiada en la EAE. Parece que los niveles de expresión del VLA-4 en la superficie celular son críticos para que la célula se pueda adherir al endotelio y secretar metaloproteinasas que se encargarán de degradar la matriz y permitir el paso de células a través del endotelio<sup>122</sup>. La administración de AcMo anti-VLA-4<sup>69</sup> o el tratamiento con péptidos inhibidores de

dicha molécula de adhesión <sup>123</sup> inhibe o reduce la intensidad de la EAE, impide la aparición de nuevos brotes una vez la enfermedad ya ha debutado <sup>124</sup> y produce una mejoría clínica y patológica en su fase crónica <sup>125</sup> . También se ha comprobado recientemente la reducción del número de lesiones cerebrales activas <sup>126</sup> y reducción del número de brotes <sup>127</sup> en pacientes EM tratados con un antagonista (Natalizumab) de la subunidad  $\alpha 4$  de la integrina  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4).

Otra MA, el CR3 (CD11b/CD18), se ha visto que está implicado en el reclutamiento de células de estirpe monocítica a los lugares de inflamación mediante la unión a su ligando ICAM-1 <sup>128</sup> . El hecho de que los AcMo anti-CR3 inhiban la EAE <sup>136,137</sup> demuestra la importancia que tiene el reclutamiento de macrófagos en la EAE.

#### **1.7.4. Moléculas de adhesión y EM**

La mayoría de estudios de las MA en la EM se han basado en el análisis de la expresión de las MA durante los diferentes estadios de la enfermedad en la autopsia de material del SNC o en linfocitos de sangre o LCR de pacientes con EM. Además se han medido en sangre y LCR de pacientes con EM las MA circulantes.

##### **1.7.4.1. Expresión selectiva de MA en el SNC**

Se han identificado niveles elevados de ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales de lesiones de EM tanto agudas como crónicas activas. Sus ligandos (LFA-1 y VLA-4, respectivamente) también han sido identificados en las células inflamatorias perivasculares de lesiones de EM <sup>131,132,133,79,134</sup> . Otros estudios han demostrado la presencia de MA en la superficie de células gliales del SNC <sup>131,133</sup> . Además de su posible papel en la migración de las células inflamatorias, se ha propuesto que la expresión de MA en las células gliales juegue un papel en la coestimulación de la célula T <sup>135,136,137,134</sup> y en interacciones con la matriz extracelular.

Las CC tienen la capacidad de regular la expresión de las MA en las células gliales <sup>138,139,140</sup> .

#### **1.7.4.2. Expresión de las MA por los linfocitos T**

Los estudios realizados sobre la expresión de MA en los linfocitos de sangre periférica han dado resultados bastante discordantes.

Elovaara y col.<sup>141,142</sup> han hallado un aumento de la proporción de linfocitos en sangre periférica que expresan VLA-4 y LFA-1, tanto en EMRR como en EMSP, mientras que otros autores han demostrado en los pacientes EM una menor expresión de VLA-4 y VLA-5<sup>143</sup> y de LFA-1 $\alpha$  y integrina- $\beta$ 1 (CD29)<sup>144</sup>. Por último, existen otros estudios de diferentes investigadores que no hallan diferencias<sup>145,145,147</sup>.

Stuber y col.<sup>146</sup> analizaron en un estudio longitudinal los patrones de expresión de VLA-4 y LFA-1 que no cambiaron significativamente a lo largo de 6 meses, a pesar de que los pacientes mostraban actividad en la RMN. Por otro lado, han coincidido diversos investigadores en hallar una disminución de la expresión de VLA-4 tras tratamiento con metilprednisolona EV<sup>141,147</sup> y tras tratamiento con IFN-beta<sup>148,149</sup>. También hay discrepancias en los estudios sobre L-selectina, hallando unos autores disminución de la L-selectina<sup>144</sup> y otros, mismos niveles en EM en brote que en controles<sup>147</sup>. Este último grupo de investigadores demuestra, por otro lado, que el tratamiento con metilprednisolona aumenta la expresión de L-selectina en monocitos.

Las células T aisladas del LCR muestran un aumento de la expresión de LFA-1, ICAM-1, VLA-3, VLA-4, VLA-5, VLA-6, LFA-3, CD2, B7-1 y CD44<sup>143,150</sup>.

En resumen, tanto en SNC, como en sangre periférica o LCR de pacientes con EM, se han hallado diferencias evidentes en el nivel de expresión de las moléculas de adhesión con respecto a la población normal, y, por otro lado, también se ha comprobado que el tratamiento con metilprednisolona de los pacientes con EM modifica los niveles de expresión de algunas de estas moléculas.

#### **1.7.4.3. Moléculas de adhesión circulantes en la EM**

Las MA no sólo se hallan como moléculas ancladas transmembrana, sino que tras la interacción con el correspondiente ligando, algunas son liberadas y circulan como



formas solubles por los fluidos corporales. En la EM se han estudiado formas circulantes de ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectina y L-selectina.

Se han descrito tanto niveles elevados, como normales y bajos de cL-selectina en la EMRR activa. Dos grupos hallaron una correlación significativa entre los niveles de cL-selectina y la presencia de lesiones captantes de gadolinio en la RMN <sup>151,152</sup>. No se han hecho estudios longitudinales. Las concentraciones séricas no se alteran con el tratamiento con IFN- $\beta$ 1b. Dosis altas IV de metilprednisolona reducen los niveles de cL-selectina en la primera semana después del tratamiento.

## 1.8. CITOCINAS

### 1.8.1 Concepto y características

El término citocina (CC) se aplica a unas proteínas producidas por las células en respuesta a una gran variedad de estímulos y que son capaces de alterar, de alguna forma, el comportamiento de otras células. Las CC son un grupo muy variado de moléculas, la mayoría de las cuales presentan muchas similitudes tanto estructurales como funcionales entre sí. En su conjunto son proteínas de entre 15 y 30 kD de peso molecular. Algunas son modificadas antes de su secreción por la incorporación de carbohidratos. Otras son sintetizadas por sus células productoras como precursores, siendo posteriormente transformadas en su forma activa. Su vida media en la circulación sanguínea u otros líquidos orgánicos es corta, asegurando así una actividad breve. A pesar de su elevado número, todas estas moléculas poseen algunas características comunes, entre las que se cuentan que son pleiotrópicas, es decir, que la misma CC es capaz de actuar en diferentes tipos celulares, que son redundantes, es decir, que distintas CC pueden producir el mismo efecto, y, por fin, que pueden influir sobre el efecto de otras CC <sup>153</sup>.

Se sabe, por otro lado, que las CC actúan induciendo la expresión de MA en las células, las cuales juegan un papel directo en la adhesión célula-célula, que es importante y necesaria, como ya se comentó en el apartado anterior, para el paso de células al SNC en la EM.

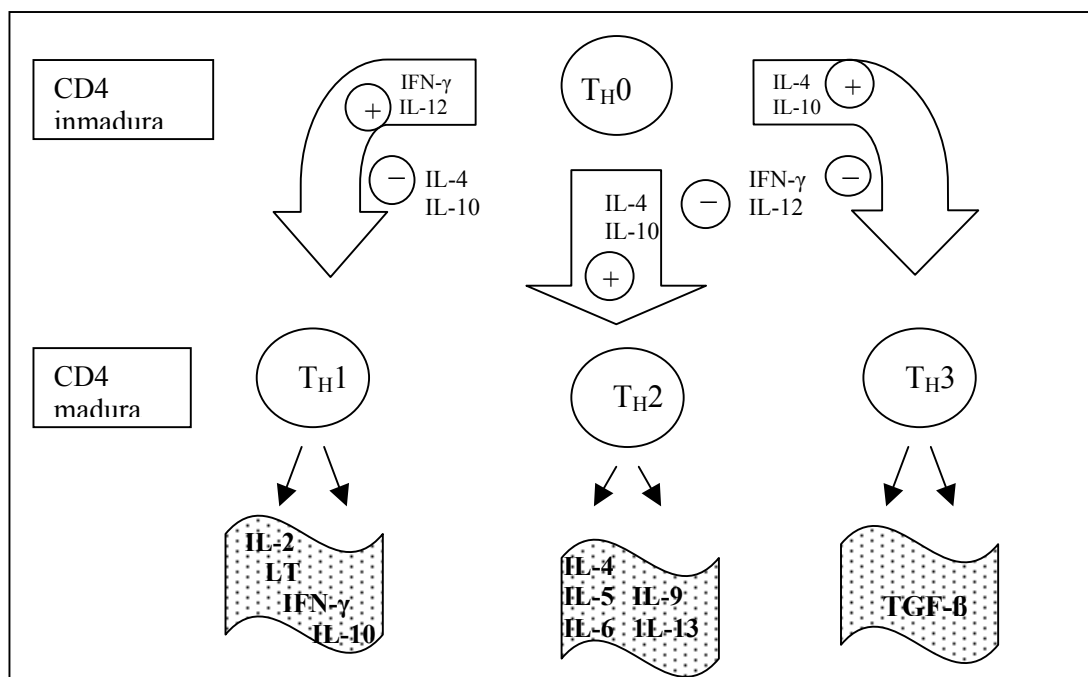
Las células T helper (Th), a las que se les ha atribuido un papel determinante en la patogenia de la EM, pueden ser divididas en dos tipos basándose en su patrón característico de secreción de CC y sus funciones efectoras. Las células Th1 producen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-12 y las células Th2 producen IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 <sup>154,155</sup>. En los últimos años se ha propuesto un nuevo subtipo en la clasificación de las células Th, aunque no está totalmente aceptado por toda la comunidad de investigadores. Este subtipo, al que se ha llamado Th3, secretaría TGF- $\beta$  y se postula que actuaría como población reguladora <sup>156</sup>.

El desarrollo de una respuesta Th1 o Th2, dependerá del ambiente de CC presente durante la presentación de antígeno, así como del tipo de péptidos y moléculas coestimuladoras implicadas <sup>157,158</sup> (Figura 1.4.). Las CC más importantes que determinan la diferenciación de las células Th son la IL-12 y la IL-4. La IL-12 es secretada principalmente por células dendríticas y macrófagos e induce la producción de IFN- $\gamma$  y al mismo tiempo suprime la secreción de IL-4, por lo que en un entorno dominado por la IL-12, se favorece la diferenciación a Th1. Por el contrario, el reconocimiento antigénico en presencia de niveles elevados de IL-4 conduce a un patrón de CC Th2.

La distinción entre linfocitos Th1 y Th2 tiene una gran importancia clínica, ya que, p.e., los linfocitos Th2 parecen tener más importancia en la respuesta alérgicas <sup>159</sup>. Por otro lado, algunos modelos experimentales de enfermedades autoinmunes órganoespecíficas como p.e. EAE, diabetes mellitus autoinmune, artritis, se ha comprobado que están mediadas por células Th1 <sup>160</sup>.

Todo esto sugiere que redirigir los perfiles de producción de CC patogénicas puede ser, en teoría, una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes.

FIGURA 1.4. Diferenciación de los subtipos de células Th (Hartung HP, 1999 <sup>161</sup> )



A las citocinas se las ha clasificado en proinflamatorias (entre las que destacan el IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$ , la linfotoxina (LT) y la IL-12) o antiinflamatorias (entre las que se cuentan el TGF- $\beta$  y la IL-10), en función del papel que ejercen en el proceso inflamatorio, pero a medida que se van conociendo mejor las funciones que ejercen, esta clasificación va perdiendo valor; se ha comprobado que varias CC ejercen tanto funciones anti como proinflamatorias según las circunstancias en que se producen <sup>162</sup>.

### **1.8.2. Citocinas y EAE**

El estudio del proceso inflamatorio en el SNC en el modelo animal de EM, la EAE, ha sido muy útil para caracterizar el papel patogénico de las CC y sus posibles aplicaciones terapéuticas. En la EAE se ha observado que se producen localmente diferentes tipos de CC según el estadio de la enfermedad.

Se ha observado que una de las primeras CC que se expresa en la fase efectora de la enfermedad es la IL-12, seguida del IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ . Sin embargo, este patrón de producción de CC no es estable, ya que durante la remisión de la enfermedad se observa un aumento de las CC Th2, incluyendo la IL-4 e IL-10, de forma que este nuevo patrón de CC reemplaza al patrón proinflamatorio inicial durante la fase de remisión de la enfermedad <sup>163,164</sup>.

### **1.8.3. Citocinas y EM**

Como ya hemos comentado anteriormente, la EM parece ser una enfermedad autoinmune del SNC mediada por células T CD4+ de tipo Th1. En este sentido, se han observado niveles elevados de CC proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2 e IFN- $\gamma$  en sangre periférica <sup>165,166,151</sup>, en LCR <sup>167,168</sup> y en lesiones cerebrales <sup>86</sup>. La asociación de estas CC proinflamatorias con la actividad de la enfermedad <sup>151,167,168</sup> implica que no sólo las células Th1 CD4+ sino también los macrófagos <sup>169,170</sup>, juegan un papel

importante en la patogenia de la enfermedad desmielinizante del SNC. Los niveles bajos y la producción deficiente de IL-10, IL-4 y TGF- $\beta$  en los pacientes con EM activa <sup>171</sup> y su papel protector en la EAE <sup>172</sup>, sugiere que las células Th2 y las CC que producen, estarían implicadas en la inducción de la remisión y en la supresión del proceso inflamatorio.

Las principales CC que se han implicado en la patogenia de la EM son el IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$ , la LT, la IL-6, la IL-12, TGF- $\beta$  e IL-10.

### IFN- $\gamma$ :

El IFN- $\gamma$  lo producen los linfocitos CD4+ activados, los CD8+ y las células NK y tiene, sobre todo, un efecto inmunomodulador. Induce la muerte de los oligodendrocitos por apoptosis, lo que apoya su potencial papel lesivo en la EM <sup>173</sup>. Se ha comprobado que la administración sistémica de IFN- $\gamma$  a pacientes con EM empeora la enfermedad <sup>174</sup>. Se ha podido observar un aumento del IFN- $\gamma$  precediendo al brote clínico <sup>175,176</sup>, así como un aumento en la EM activa <sup>177,178</sup> y en la EMSP <sup>179</sup>. También se ha hallado en pacientes EM un aumento del número de células mononucleares en sangre y LCR que producen IFN- $\gamma$  tras estimulación in vitro <sup>57,180</sup> y un gran aumento en la expresión de su ARNm comparado con controles sanos y otras enfermedades neurológicas no inflamatorias <sup>181</sup>. También se ha observado la presencia de IFN- $\gamma$  en las lesiones de EM <sup>182</sup>.

### TNF- $\alpha$ :

Entre los efectos que produce, destaca la inducción de la expresión de selectinas en las células endoteliales vasculares y la estimulación de la producción de CC como la IL-1, la IL-6 y la IL-8 por los fagocitos mononucleares.

En lesiones de EM, especialmente en lesiones activas agudas y crónicas, se ha detectado TNF- $\alpha$  en astrocitos, microglía y células endoteliales <sup>183,79</sup>. Sin embargo, los estudios que relacionan el TNF- $\alpha$  con la actividad de la enfermedad son contradictorios. Algunos grupos han descrito niveles elevados de TNF- $\alpha$  en LCR correlacionándolos con la severidad de la enfermedad <sup>167,166,184</sup>, mientras que otros no encuentran diferencias ni correlación <sup>185,186,187</sup>. Esto puede deberse, probablemente, tanto a la diferente

metodología utilizada como al grupo de pacientes estudiado. Sin embargo, los estudios de expresión de ARNm encuentran niveles elevados tanto en sangre como en LCR de pacientes con EM <sup>188</sup>. Estudios cuantitativos de ARNm mediante PCR hallan niveles más elevados en pacientes con formas crónicas progresivas <sup>189</sup> o durante los brotes de la enfermedad <sup>190</sup>.

### LT o TNF-β:

La LT se produce únicamente por los linfocitos T y tiene los mismos efectos que el TNF-α aunque se produce en cantidades muy inferiores.

Se ha identificado junto con el TNF-α en lesiones cerebrales de EM <sup>79</sup>. También se han observado niveles elevados de su ARNm en sangre <sup>191,192</sup> y LCR <sup>188</sup> de pacientes con EM comparado con controles sanos o pacientes con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias. Se ha hallado una correlación positiva entre los niveles de expresión de ARNm de la LT-α y el TNF-α en EM, lo que sugiere que la LT-α podría actuar junto con el TNF-α y otras CC proinflamatorias contribuyendo a la perpetuación del proceso inmunopatológico <sup>188</sup>.

### IL-12:

Entre las principales funciones de la IL-12 destaca su capacidad de inducir proliferación y secreción de CC (sobre todo de IFN-γ) en linfocitos T y células NK.

Segal et col. <sup>193</sup> han demostrado que la producción endógena de IL-12 es crítica para la generación de células T autoreactivas Th1, dado que la EAE no puede ser inducida en ratones deficitarios en IL-12. Por otro lado, las propiedades proinflamatorias de la IL-12 se han comprobado en la EAE, ya que se ha visto que la administración de esta CC empeora la enfermedad <sup>194</sup>, mientras que AC contra la IL-12 previenen la EAE <sup>195</sup>. En la EM, también se ha demostrado la existencia de un aumento de la expresión de esta CC en las placas agudas <sup>196</sup>. En las formas EMCP se ha observado un incremento en la producción de IL-12 en células de sangre periférica <sup>197,178</sup> y concentraciones elevadas en suero <sup>198</sup>.

## IL-6:

Además de intervenir en la diferenciación de las céls. B, la IL-6 estimula la proliferación de células T tímicas y periféricas, y en cooperación con la IL-1, induce la diferenciación de las células T hacia células T citotóxicas y activa las células NK.

Varios estudios han mostrado que la sobreexpresión crónica de IL-6 en ratones transgénicos puede conducir a significativos cambios neuroanatómicos y neurofisiológicos en el SNC similares a los hallados con frecuencia en varias enfermedades neurológicas. Por otro lado, se ha observado que los ratones "knock out" de IL-6 son resistentes a la EAE inducida con MOG, y que no presentan infiltrado de células inflamatorias en los cortes histológicos<sup>199</sup>.

Varios autores hallan un aumento de los niveles séricos de IL-6 en los pacientes con EM<sup>200,201,202,203</sup>. Uno de ellos halla los mayores niveles en los pacientes con formas más severas de la enfermedad<sup>202</sup> y otro, en los pacientes en brote<sup>203</sup>. También se ha comprobado un aumento de los niveles de IL-6 en LCR de pacientes EM<sup>202,201</sup>.

Se ha detectado asimismo mayor número de monocitos secretores de IL-6 en pacientes con EM tanto en sangre periférica<sup>204,205,206</sup> como en LCR<sup>204</sup>, y niveles elevados de ARNm de IL-6 en células mononucleares de pacientes con EM<sup>191,192,204</sup>.

## TGF-beta:

El TGF- $\beta$  induce un efecto inhibitor sobre las células NK y hace que los linfocitos B produzcan menos inmunoglobulinas. También inhibe los efectos del IFN- $\gamma$  sobre los fagocitos mononucleares

Existen evidencias que sugieren un efecto beneficioso del TGF-beta en la EM. Se ha observado un aumento de esta CC en sobrenadantes de cultivos en sangre de pacientes con EM en período de remisión, tras estimulación con mitógenos<sup>207</sup>. También se ha observado que las líneas celulares de pacientes con enfermedad activa producen menos TGF- $\beta$  que las de los estables<sup>171</sup>. En este sentido, se han correlacionado inversamente los niveles elevados de expresión de su ARNm con la severidad de la enfermedad<sup>181,191,192</sup>. También se ha demostrado que el TGF- $\beta$  puede inhibir la producción de otras CC, como p.e. de IFN- $\gamma$  e IL-4<sup>208</sup>.

## IL-10:

Es la CC antiinflamatoria más importante descrita hasta el momento. Entre las principales funciones de la IL-10 se cuenta la capacidad de inhibir la proliferación de los linfocitos T estimulados por el antígeno. La IL-10 también disminuye la producción de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-3, GM-CSF, TNF- $\alpha$  y LT, pero no la de IL-4.

En la EAE se ha demostrado una expresión del ARNm de la IL-10 más elevada en períodos de remisión de la enfermedad <sup>209</sup>, lo que apoya el papel antiinflamatorio de esta CC.

En este mismo sentido, Huang y col. <sup>189</sup>, y Özenci y col. <sup>210</sup> han hallado un menor número de células que expresan IL-10 en los pacientes EM que en los controles. Rieckmann y col. <sup>191,192</sup> han observado que en pacientes con EM estable los niveles de expresión de ARNm son superiores que en los pacientes que están en brote, y que estos niveles disminuyen antes de un brote en muestras consecutivas de sangre de pacientes con EM. También se han demostrado niveles séricos de IL-10 inferiores en pacientes EM que en controles <sup>211</sup>.

En desacuerdo con estos resultados está el estudio de Navikas y col. <sup>212</sup> que demuestra un mayor número de células mononucleares que expresan RNAm de IL-10 en sangre de pacientes EM.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **2.1. HIPÓTESIS**

El 20% de los pacientes con EM tiene una historia familiar de al menos un caso adicional de EM y el riesgo de padecer la enfermedad es mayor cuanto mayor es el grado de parentesco. Por otro lado, se ha comprobado que otras enfermedades autoinmunes también son más frecuentes en los familiares de primer grado de pacientes con EM<sup>213,214</sup>.

Basándonos en la existencia de esta agregación familiar en la EM y en la patogenia autoinmune de la misma, formulamos la siguiente hipótesis:

Los familiares sanos de pacientes EM pertenecientes a familias multiplex, presentan similitudes con los pacientes en algunos parámetros inmunológicos implicados en la patogenia de la EM, que reflejan su mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad.

## **2.2. OBJETIVO**

Comprobar si existen similitudes en algunos parámetros inmunológicos entre los miembros sanos y enfermos de familias en las que hay más de un miembro que padece la enfermedad (familias multiplex).

Para ello comparamos:

1. expresión de moléculas de adhesión : CD29, CD49d, L-selectina
2. expresión de receptores de quimiocinas: CCR5, CXCR3
3. producción de citocinas por leucocitos activados: IFN-gamma, IL-6

entre el grupo de pacientes EM (n=26) , grupo de familiares sanos (n=29) y grupo control sano (n=26) de 13 familias multiplex.

Compararemos también los valores medios de los pacientes, familiares sanos y controles sanos dentro de cada familia individualmente.

### **3. MATERIAL Y MÉTODO**

### 3.1.SUJETOS

#### 3.1.1. Familias EM Multiplex

Se estudiaron 13 familias, en las que dos o más miembros emparentados en primer o segundo grado, presentaban EM.

En cada familia se estudiaron los siguientes sujetos:

- dos pacientes EM, unidos por un parentesco familiar de primer o segundo grado
- uno o más hermanos sanos de uno de los dos pacientes

A continuación se detallan las familias.

<b>FAMILIA</b>	<b>PACIENTE EM</b>	<b>FAMILIAR SANO</b>	<b>TOTAL</b>
1	2 (HERMANOS)	1 HERMANO	3
2	2 (HERMANOS)	5 HERMANOS	7
3	2 (MADRE e HIJA)	1 HERMANO de la HIJA	3
4	2 (HERMANOS)	1 HERMANO	3
5	2 (PADRE e HIJA)	3 HERMANOS del PADRE	5
6	2 (PRIMAS HERMANAS)	2 HERMANOS de una PRIMA	4
7	2 (PADRE e HIJA)	2 HERMANOS de la HIJA	4
8	2 (HERMANOS)	5 HERMANOS	7
9	2 (HERMANOS)	1 HERMANO	3
10	2 (HERMANOS)	3 HERMANOS	5
11	2 (HERMANOS)	1 HERMANO	3
12	2 (HERMANOS)	1 HERMANO	3
13	2 (PADRE e HIJO)	3 HERMANOS del HIJO	5
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>29</b>	<b>55</b>

### **3.1.2. Pacientes**

#### **3.1.2.1. Pacientes índice**

Los pacientes incluidos en el estudio son pacientes que siguen un control periódico en la Unitat de Neuroinmunologia Clínica (UNIC) del Servicio de Neurología de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron de Barcelona.

Los requisitos que se exigieron para su inclusión fueron:

- Haber sido diagnosticados de EM definida según los criterios de Poser (Poser CM y col., 1983)
- Tener uno o más familiares de primer o segundo grado diagnosticados de EM
- No haber presentado brotes en los dos meses anteriores ni posteriores a la extracción de sangre
- No haber recibido tratamiento con prednisona ni con metilprednisolona en los dos meses anteriores a la extracción
- No haber recibido medicación inmunosupresora como ciclofosfamida, azatioprina o metotrexato
- No haber recibido tratamiento con IFN-beta
- No haber presentado ningún tipo de infección o proceso inflamatorio en el momento de la extracción

#### **3.1.2.2. Familiares EM**

Los familiares con EM habían sido diagnosticados de EM definida según los criterios de Poser en la UNIC del Hospital Universitari de la Vall d'Hebron o en otro centro hospitalario. En este último caso se exigió para la inclusión en el estudio que aportaran

información escrita procedente del centro donde seguían control que confirmara el diagnóstico de EM definida.

La extracción de sangre se realizó en todos los casos en la UNIC del Hospital Universitari de la Vall d'Hebron.

Se establecieron las mismas condiciones de inclusión que en los pacientes índice.

La única variable clínica tenida en cuenta en el estudio fue la forma clínica de EM: EMRR, EMSP o EMPP.

### **3.1.2.3. Familiares sanos**

Debían cumplir los siguientes requisitos

- ser familiares de primer o segundo grado de los pacientes EM
- no tener ni haber tenido nunca evidencia clínica de enfermedad. Se descartó la práctica de exploraciones paraclínicas como RMN craneal, PE o estudio de bandas oligoclonales en LCR, por cuestiones éticas.
- no padecer ninguna otra enfermedad de posible origen autoinmune
- no haber presentado ningún tipo de infección o proceso inflamatorio en el momento de la extracción
- no haber recibido tratamiento con corticoides en los dos meses previos a la extracción
- no haber recibido tratamiento inmunosupresor

### **3.1.3. Grupo control sano**

Como grupo control sano se incluyeron individuos sanos apareados por edad y sexo procedentes del personal sanitario o administrativo del Centro de Asistencia Primaria de Horta y sus familiares.

### 3.2 REACTIVOS/TAMPONES

- PBS: tampón fosfato salino (Gibco BRL, Life Technologies LTD, Paisley, Scotland)
- FCS: suero de ternera fetal (inactivación del complemento por calor; Sigma Aldrich)
- PBS suplementado (estéril): PBS+2%FCS+50 U/ml penicilina/ estreptomicina (Sigma Aldrich)
- Tampón de lavado FACS (TL): PBS + 1%FCS + 0.1% azida sódica (Sigma-Aldrich)
- Ficoll (Gibco)
  
- RPMI completo (estéril): RPMI 1640 suplementado con FCS + 50 U/ml penicilina/estreptomicina + 2% tampón HEPES + 1% piruvato + 1% aminoácidos no esenciales + 2mM L-glutamina (Gibco BRL):
  - RPMI-2 (2% FCS) : medio de cultivo para separación de PBMC
  - RPMI-5 (5% FCS): medio de cultivo estimulación de células para producción de citocinas
  - RPMI-10 (10% FCS): medio de cultivo para descongelación de PBMC
  
- Medio de congelación: RPMI-20 (20% FCS) + 20% DMSO (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania))
  
- Tampón de fijación-permeabilización Cytofix-Cytoperm (PharMingen, San Diego, California)
  
- Tampón de permeabilización-lavado Permwash (PharMingen)

### 3.3. ANTICUERPOS MONOCLONALES

- Anti-CD3-aloficocianina (APC)
- Anti-CD3-ficoeritrina (PE)
- Anti-CD8-proteína clorofílica de peridinium (PerCP)
- Anti-CD4-PerCP
- Anti-CD14-APC (Becton & Dickinson, Immunocytochemistry Systems, San Jose, CA)
- Anti-CD64-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA)
- Anti-CD69-PE (Becton & Dickinson )
- Anti-HLA-DR-PerCP (Becton & Dickinson)
- Anti-CD49d(alfa-4-integrina)-PE(Becton & Dickinson)
- Anti-CD29 (beta-1-integrina)-FITC (Immunotech, Praga, Rep.Checa)
- Anti-CD62L (L-selectina)- FITC (Becton & Dickinson)
- Anti-CCR5 - FITC (Pharmlngen)
- Anti-CXC3 - FITC (R&D Systems, Europe, Oxon, United Kingdom)
- Anti-IFN-gamma-FITC (Pharmlngen)
- Anti-IL-6-PE (Pharmlngen)
- Anticuerpos anti-IgG control - PE, FITC, PerCP (Becton & Dickinson, Caltag Laboratories, Pharmlngen)



### **3.4. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)**

De cada paciente y control se obtuvieron 40 ml de sangre periférica en tubos estériles con heparina (Becton & Dickinson) y se diluyeron con 20 ml de PBS suplementado. Cada muestra de sangre se repartió en tres tubos, disponiendo 20 ml de sangre diluida sobre 10 ml de ficoll. A continuación se centrifugaron los tubos durante 25 minutos a 1750 rpm y 19°C, quedando así los eritrocitos en el fondo del tubo y las células mononucleadas en la interfase entre el ficoll y el sobrenadante. Tras recuperar las PBMC de la interfase por aspiración, se lavaron dos veces con PBS. Después de eliminar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 1 ml de RPMI-2, y se procedió al recuento de células en la cámara de Neubauer. Finalmente, se alicuotaron las células suspendidas en RPMI-2, se les añadió el mismo volumen de medio de congelación y se congelaron a -80°C durante 24 horas y luego en nitrógeno líquido hasta su utilización.

### **3.5. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y RECEPTORES DE QUIMIOKINAS EN PBMC**

La determinación de la expresión en membrana de las moléculas estudiadas se realizó mediante la técnica de citometría de flujo, utilizando 4 fluorocromos diferentes (FITC, PE, PerCP, APC). El protocolo que se utilizó se especifica a continuación.

#### **3.5.1. Descongelación de las PBMC**

Para realizar la descongelación de las PBMC se siguieron los siguientes pasos:

- se sacaron las células conservadas en nitrógeno líquido y se dejaron durante 30 minutos a -80°C.
- se agitaron suavemente los criotubos en un baño maría a 37°C hasta comprobar el inicio de la descongelación; en este momento se añadió 1 ml de RPMI-10 y se traspasó la muestra a otro tubo con 9 ml de RPMI-10 para completar los 10 ml
- una vez confirmada la completa descongelación, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos
- a continuación se resuspendió la muestra en 1 ml de RPMI-5 y se procedió al recuento de las células en la cámara de Neubauer

### 3.5.2. Tinción de superficie

En cada experimento se analizaron muestras de todos los grupos de estudio (2 pacientes EM, x familiares sanos y 2 controles sanos). De cada muestra se añadieron 600.000 células/pocillo, en 5 pocillos de una placa de 96 (Bibby Sterilium Ltd., Staffordshire, UK). A continuación se bloquearon las uniones inespecíficas mediante la incubación de las células durante 15 minutos con 10 µl de un pool de suero AB humano inactivado. Posteriormente se añadieron los anticuerpos monoclonales en concentraciones saturantes y se incubaron durante 30 minutos a 4°C protegidos de la luz (Tabla 1.)

TABLA 1. Plantilla para la tinción de moléculas expresadas en la membrana celular

SITUACIÓN 1	SITUACION 2	SITUACION 3	SITUACION 4	SITUACION 5
CD29-FITC	CCR5-FITC	CXCR3-FITC	CD62L-FITC	IgG-FITC
CD49d-PE	CD3-PE	CD3-PE	CD3-PE	IgG-PE
CD3-APC	CD4-PerCP	CD4-PerCP	CD4-PerCP	IgG-PerCP
CD4-PerCP	CD14-APC	CD14-APC	CD14-APC	IgG-APC

Tras la incubación y para eliminar el exceso de anticuerpos, se lavó con 200  $\mu$ l de TL, y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. Después se decantó y se recogieron las células resuspendidas en 400  $\mu$ l de TL en tubos para proceder a su adquisición en el citómetro de flujo (FacsCalibur, Becton & Dickinson).

### **3.5.3. Análisis de la expresión en membrana celular de las moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas**

El análisis se realizó con el programa CellQuest® (Becton & Dickinson). Se seleccionó una región correspondiente a la población total de linfocitos (R1) mediante las características de volumen (FSC, Forward light-scatter) y rugosidad (SSC, Side light-scatter) de las células (Figura 1.). De esta región se seleccionó otra región (R2) con los linfocitos T (CD3+), y, de esta región se analizaron los linfocitos CD4 positivos para la molécula en estudio. La región de monocitos (R3) se marcó en base a sus características físicas (FSC/SSC). De esta región se seleccionaron las células CD14+(R4), y de la misma forma que en los linfocitos, de esta región se analizaron los monocitos positivos para la molécula en estudio (Figura 2.). El porcentaje de células que expresan una determinada molécula se calculó restando la señal del anticuerpo isotipo control a cada una de las señales de los anticuerpos específicos. Los resultados se expresaron tanto en porcentaje de células positivas como en la intensidad media de fluorescencia (IMF).

FIGURA 1. Selección de la población de linfocitos para el análisis por citometría de flujo

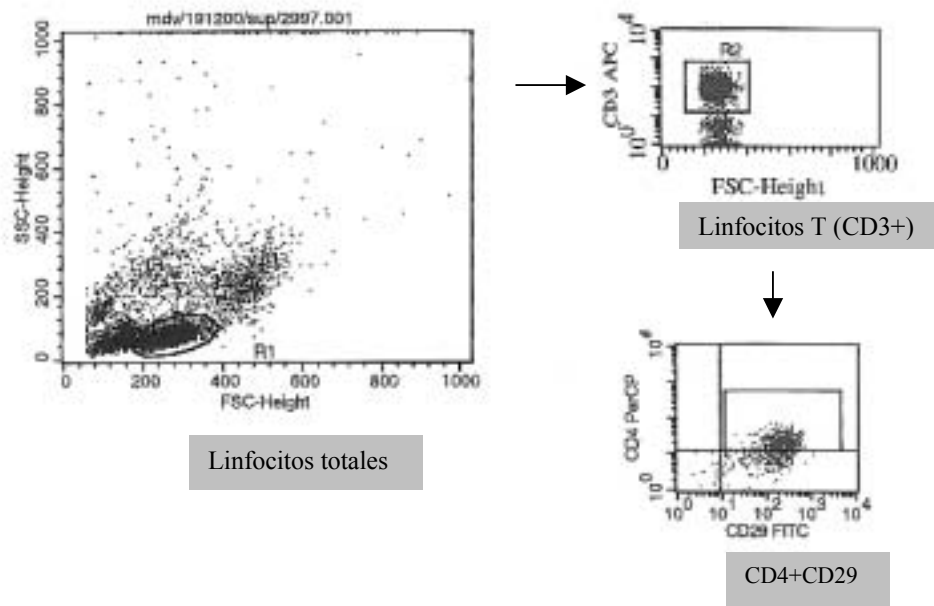
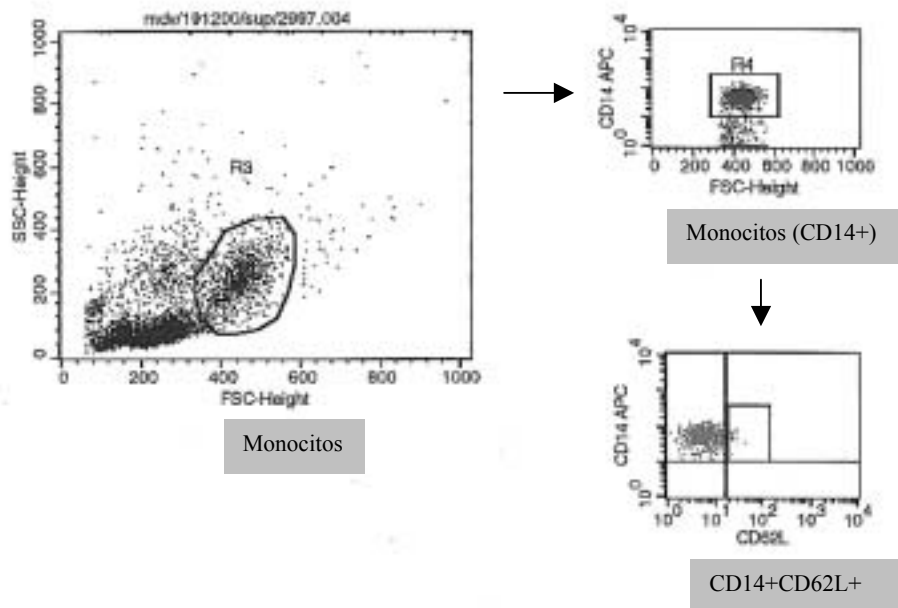


FIGURA 2. Selección de la población de monocitos para el análisis por citometría de flujo



### **3.6. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN PBMC**

La determinación de la producción de citocinas se realizó mediante la técnica de citometría de flujo utilizando 3 fluorocromos diferentes (FITC, PE, PerCP). El protocolo que se utilizó se especifica a continuación

#### **3.6.1. Descongelación de PBMC**

Se siguió el mismo procedimiento que el descrito en el apartado 3.5.1. También en este caso se analizó una muestra de cada grupo (2 pacientes EM, x familiares sanos y 2 controles sanos) en cada experimento.

#### **3.6.2. Estimulación de PBMC**

Las células descongeladas se incubaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo (RPMI-5) con el estímulo adecuado para la producción de las dos citocinas a determinar:

- a) IFN- $\gamma$ : Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (50 ng/ml) (Sigma Aldrich) + ionóforo de calcio (250 ng/ml) (Sigma-Aldrich) durante 4h
  
- b) IL-6: Lipopolisacárido (LPS) de E.Coli serotipo 0128:B12 (100 ng/ml) (Sigma Aldrich) durante 24 horas

Se añadió monensina (2 $\mu$ M) (GolgiStop, PharMingen) a los cultivos para inhibir el transporte extracelular de proteína sin alterar la síntesis de novo, permitiendo la acumulación de citocinas, con el fin de que los niveles de éstas fueran detectables.

Como control negativo se determinó la producción de citocinas en cultivos sin estimular a los que únicamente se había añadido monensina.

### **3.6.3. Tinción intracelular para la determinación de producción de citocinas**

Tras la estimulación, las células fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante se resuspendieron en 400  $\mu$ l de TL. Posteriormente se repartieron las células en los pocillos de la placa (  $1 \times 10^6$  células/pocillo) para proceder a su tinción intracitoplasmática. Se bloquearon las uniones inespecíficas con 10  $\mu$ l de suero AB durante 15 minutos a 4°C, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se decantaron. Para la tinción, se añadieron los anticuerpos monoclonales (Tabla 2.) en concentraciones saturantes para marcar las diferentes poblaciones celulares (CD3+, CD4+, CD64+) y la activación celular (CD69 y HLA-DR) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C protegidos de la luz. En este experimento para seleccionar la población de monocitos se utilizó el CD64 en vez del CD14, dado que para la determinación de IL-6 las células se estimularon con LPS y el CD14 es uno de sus receptores. Tras el período de incubación, se lavaron con 200  $\mu$ l de TL, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se decantaron. Después, las células se fijaron y se permeabilizaron añadiendo 100  $\mu$ l de tampón Cytofix/Cytoperm y se incubaron durante 20 minutos a 4°C protegidas de la luz. Pasado este tiempo, se lavó la placa con 100  $\mu$ l de tampón Permwash, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, y se decantó. Seguidamente se añadieron los anticuerpos monoclonales anti-citocina en concentraciones saturantes (Tabla 2.) y se dejaron incubar 30 minutos a 4°C protegidos de la luz. A continuación, se lavó la placa con 200  $\mu$ l de tampón Permwash, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos y se decantó. Después se recogieron

las células en 400 µl de TL en tubos y se procedió a su adquisición en el citómetro de flujo (FacsCalibur, Becton & Dickinson).

TABLA 2. Tinción celular para el estudio de la producción de citocinas

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	anti-IFN- $\gamma$ -FITC	anti-CD69-PE	anti-CD8+-PerCP	anti-CD3+-APC
	TINCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA	TINCIÓN DE SUPERFICIE		

<b>IL-6</b>	anti-IL-6-PE	anti-CD64+-FITC	anti-HLA-DR-PerCP
	TINCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA	TINCIÓN DE SUPERFICIE	

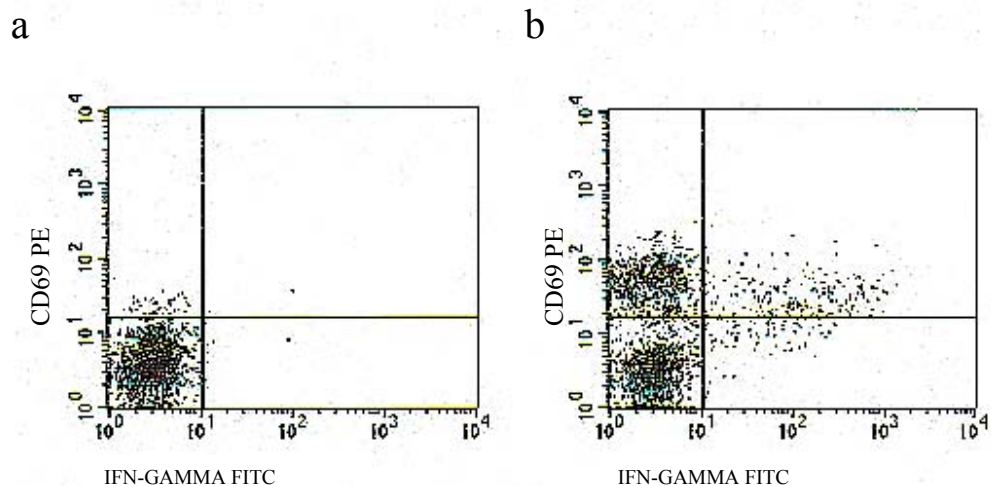
### 3.6.4. Análisis de la producción de citocinas

El análisis se realizó con el programa CellQuest<sup>®</sup> (Becton & Dickinson). La producción intracelular de IFN- $\gamma$  se determinó en los linfocitos T (CD3+), linfocitos T CD8+ (CD3+CD8+) y linfocitos T CD4+ (CD3+CD8-), y la producción de IL-6 en monocitos (CD64+). El porcentaje de células productoras de citocinas se calculó restando la señal emitida por las células productoras de citocinas del control sin estimular de la señal de las células productoras estimuladas (Figura 3.). Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas y como intensidad media de fluorescencia (IMF) por célula.

FIGURA 3. Producción de IFN-gamma por los linfocitos

a: producción basal de IFN-gamma en linfocitos sin estimular (CD69-)

b: producción de IFN-gamma en linfocitos estimulados con PMA (CD69+)



### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con la versión 6.0 del programa estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS).

Para comparar los valores obtenidos en el análisis de las moléculas estudiadas entre el grupo de pacientes EM, el grupo de familiares sanos y el grupo control, se aplicaron pruebas paramétricas (Test de Anova) o no paramétricas (Kruskal Wallis) para muestras independientes.

Dada la variabilidad de los valores de la intensidad media de fluorescencia entre las diferentes familias, para comparar los valores se utilizaron variables estandarizadas (z score). Se consideraron niveles de significación estadística a  $p < 0,05$ .



## **4. RESULTADOS**

## 4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

### 4.1.1. Grupo de pacientes

#### 4.1.1.1. Edad y sexo

Se estudiaron 13 Familias Múltiple , es decir, 13 familias en las que 2 ó más miembros, emparentados en primer o segundo grado, presentaban EM.

En total, se sometieron a estudio 55 sujetos, 26 pacientes EM y 29 familiares sanos.

En la Tabla 4.1.se detallan las familias estudiadas y los sujetos estudiados en cada una de ellas.

TABLA 4.1. Composición de las Familias Múltiple

FAMILIA	PACIENTE EM	FAMILIAR SANO	TOTAL
1	2	1	3
2	2	5	7
3	2	1	3
4	2	1	3
5	2	3	5
6	2	2	4
7	2	2	4
8	2	5	7
9	2	1	3
10	2	3	5
11	2	1	3
12	2	1	3
13	2	3	5
TOTAL	26	29	55

En las Tablas 4.2.y 4.3. se detalla la distribución de los sujetos estudiados por edad y sexo.

TABLA 4.2. Descripción del sexo

	HOMBRE	MUJER	TOTAL
PACIENTE EM	11 (42.3%)	15 (57.7%)	26
FAMILIAR SANO	16 (55.2%)	13 (44.8%)	29
TOTAL	27 (49%)	28 (51%)	55

TABLA 4.3. Descripción de edad

	MEDIA	DESV STD	CASOS
PACIENTE EM	38,92	11,53	26
FAMILIAR SANO	39,48	11,24	29
TOTAL	39,24	10,9	55

#### 4.1.1.2. Variables clínicas

De los 26 pacientes estudiados, 21 padecían una forma EMRR en fase de remisión y 5 una forma SP (Tabla 4.4.)

TABLA 4.4. Forma clínica de EM

FORMA	FRECUENCIA
EMRR	21 (80.8%)
EMSP	5 (19.2%)

### 4.1.2. Grupo control

Se seleccionaron 26 controles sanos como grupo control con las siguientes características clínicas (Tabla 4.5.)

- edad: 39.3 con desviación standard de 10.28
- sexo: 11 hombres / 15 mujeres

TABLA 4.5. Descripción de edad y sexo

NUMERO	EDAD (Media $\pm$ dsv.std)	SEXO (V:H)
26	39,3 $\pm$ 10,28	1:1,3

### 4.1.3. Comparación entre pacientes y grupo control

#### 4.1.3.1. Edad y sexo

Todos los sujetos estudiados son comparables en edad y sexo.

No hubo diferencias estadísticamente significativas para estas dos variables entre ninguno de los tres grupos : pacientes EM, familiares sanos y controles sanos.

## **4.2. ANALISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS**

Comparamos la producción de IFN-gamma e IL-6 por las PBL de 29 pacientes EM, 26 familiares sanos y 26 controles sanos.

Analizamos la producción de IFN-gamma por los linfocitos T (CD3+) y las subpoblaciones CD4+ y CD8+, y la producción de IL-6 por los monocitos.

### **4.2.1. Análisis de la producción de IFN- $\gamma$**

Las PBL de los pacientes, los familiares sanos y los controles sanos fueron estimuladas con PMA durante 4 horas para inducir la producción de IFN- $\gamma$  y, posteriormente, sometidas a una tinción intracelular con anticuerpos monoclonales anti-IFN- $\gamma$  marcados.

El porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$  fue significativamente superior en los pacientes EM y sus familiares sanos que en la población control ( $p=0,01$ ). Esta tendencia también se mantuvo cuando se analizaron separadamente las subpoblaciones CD4+ y CD8+, pero sin llegar a alcanzar significación estadística ( $p=0,08$  y  $p=0,07$  respectivamente) (Figura 4.1.). En la Figura 4.2. se describen los porcentajes de linfocitos productores de IFN- $\gamma$  en las 13 familias estudiadas. En la familia número12 no pudimos disponer de los datos correspondientes al familiar sano por un problema técnico.

FIGURA 4.1. Comparación entre pacientes, familiares sanos y controles del porcentaje de linfocitos T (CD3+), y de sus subpoblaciones CD4+ y CD8+, productores de IFN- $\gamma$

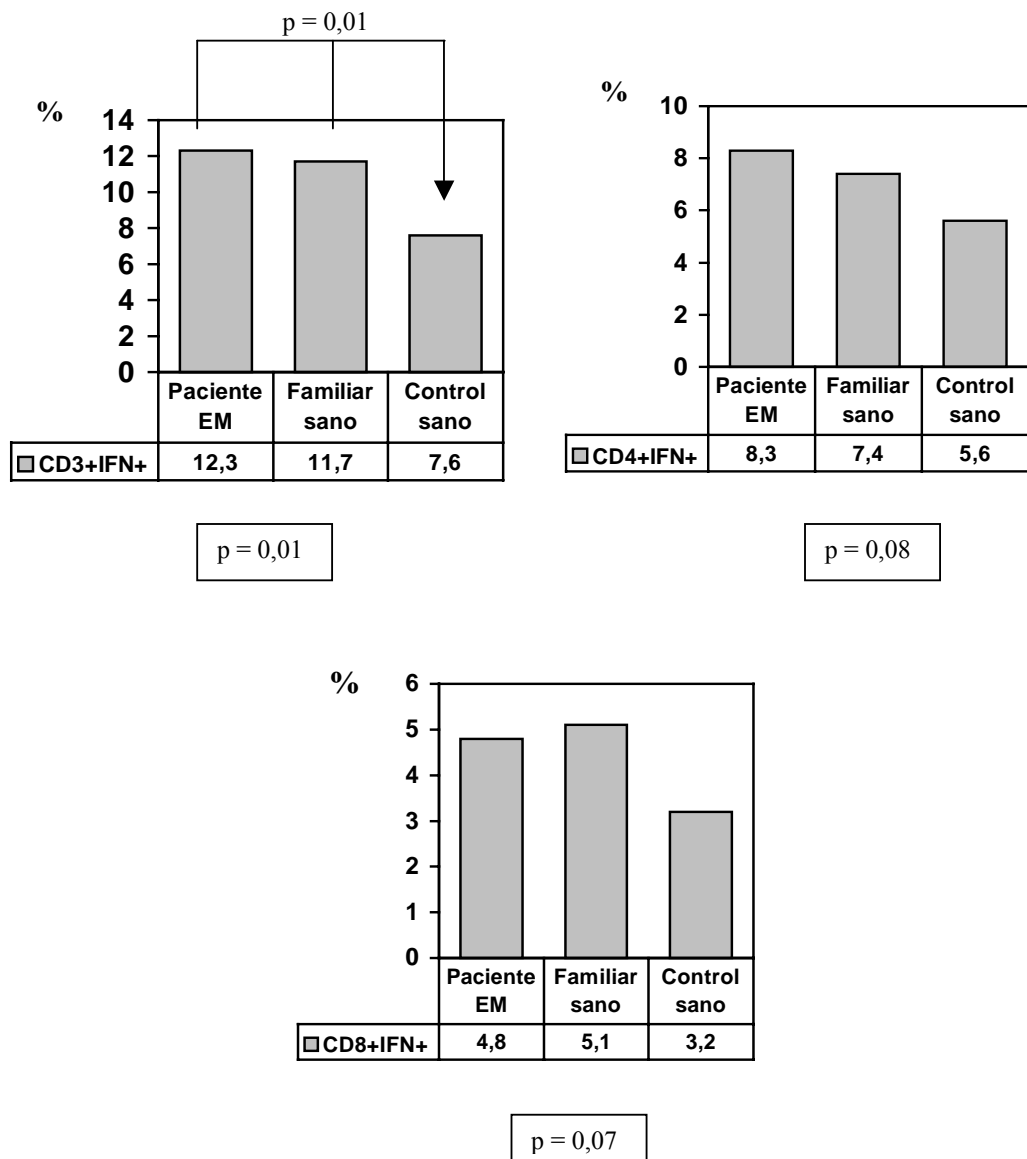
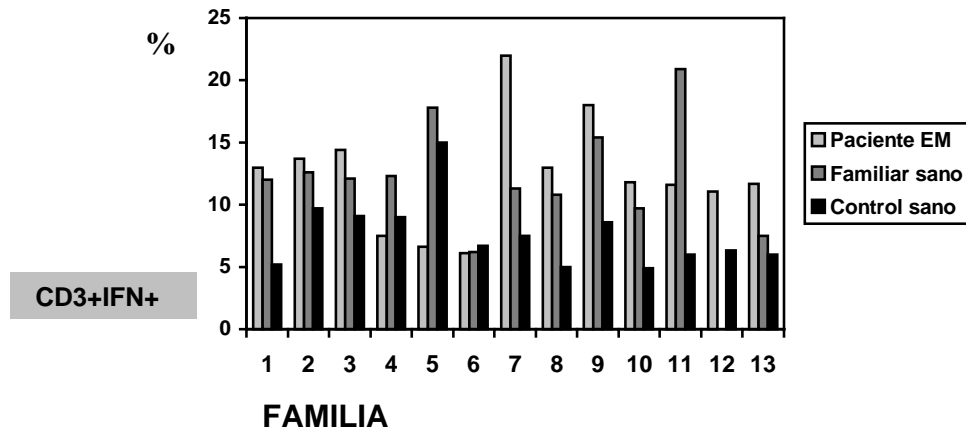
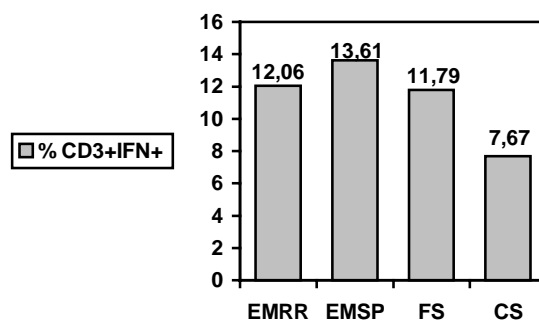


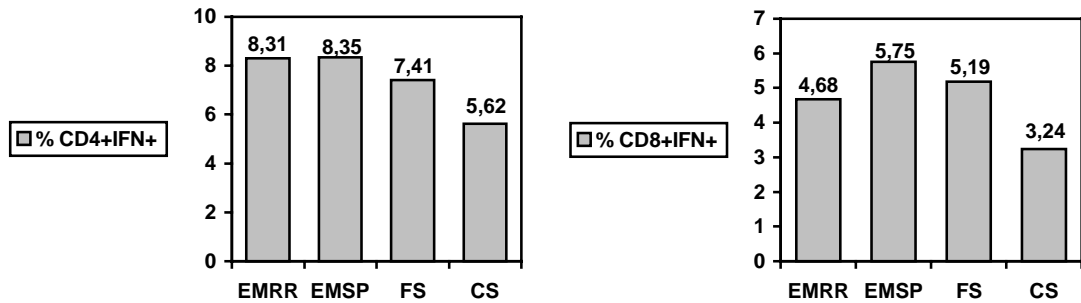
FIGURA 4.2. Descripción del porcentaje de linfocitos productores de IFN- $\gamma$  en todas las familias



En el análisis de la producción de IFN- $\gamma$  según la forma clínica de EM, se observó una ligera mayor producción en las formas SP que en las formas RR aunque la diferencia no fue significativa (Figura 4.3.). Excluyendo las formas SP del análisis estadístico, el porcentaje de linfocitos productores de IFN- $\gamma$  continuó siendo significativamente superior en los pacientes que en los controles sanos ( $p=0,01$ ).

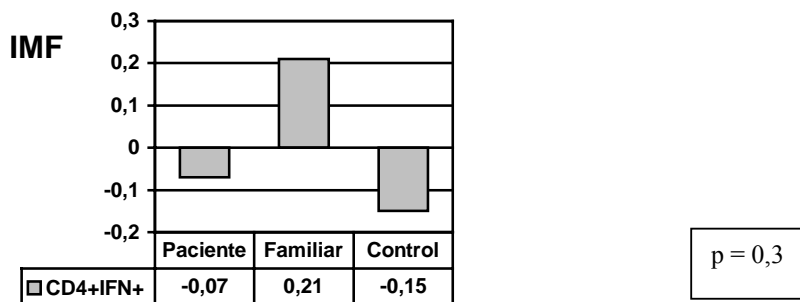
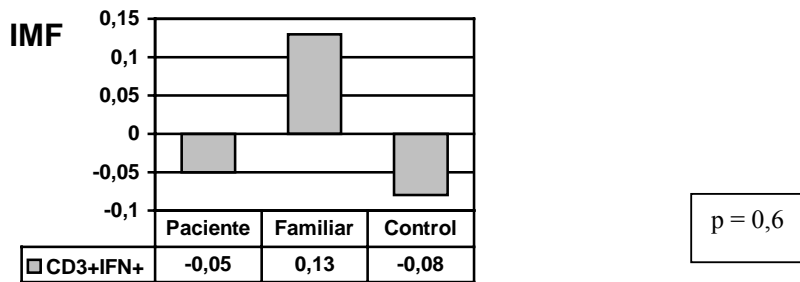
FIGURA 4.3. Descripción del porcentaje de linfocitos T (CD3+) y de sus subpoblaciones CD4+ y CD8+ productores de IFN- $\gamma$  según la forma clínica de EM (EMRR-EMSP); FS = familiar sano, CS = control sano.



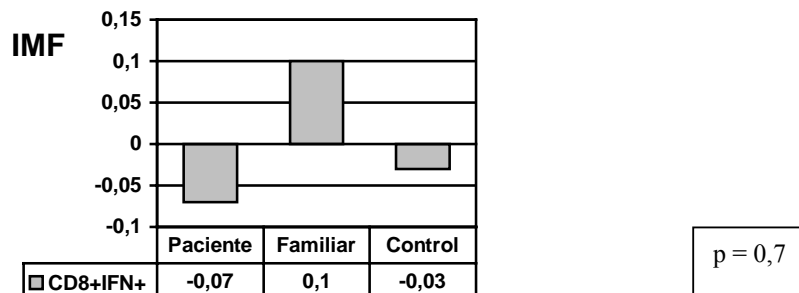


La intensidad media de inmunofluorescencia fue también ligeramente más elevada en pacientes y familiares sanos que en controles sanos en los linfocitos CD3+ y CD4+, pero sin alcanzar significación estadística (Figura 4.4.).

FIGURA 4.4. Comparación entre pacientes, familiares sanos y controles sanos de la intensidad media de fluorescencia estandarizada (z score) de IFN- $\gamma$  en linfocitos T (CD3+) y sus subpoblaciones CD4+ y CD8+.







#### 4.2.2. Análisis de la producción de INTERLEUCINA-6

Se estimularon los monocitos de los pacientes y controles con LPS durante 24 horas para inducir la producción de IL-6 y posteriormente se realizó la tinción intracelular con el anticuerpo monoclonal anti-IL-6 marcado.

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de sujetos en el porcentaje de monocitos productores de IL-6 (Figura 4.5.).

Al realizar el análisis según la forma clínica de los pacientes, se observó una mayor producción en las formas SP que en la RR, aunque tampoco hubo diferencias significativas entre los cuatro grupos analizados (Figura 4.6.).

FIGURA 4.5. Comparación del porcentaje de monocitos productores de IL-6 entre pacientes, familiares sanos y controles sanos.

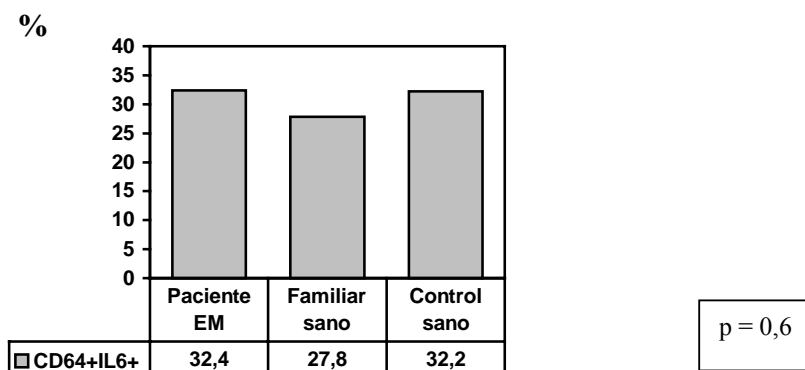
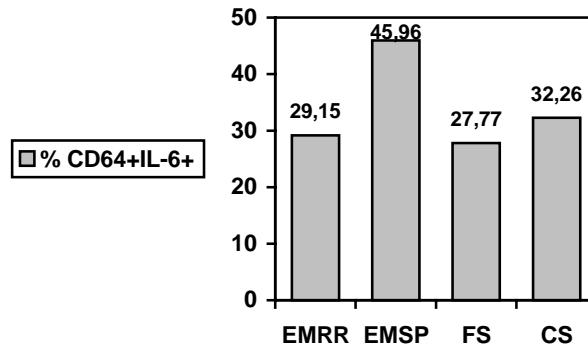
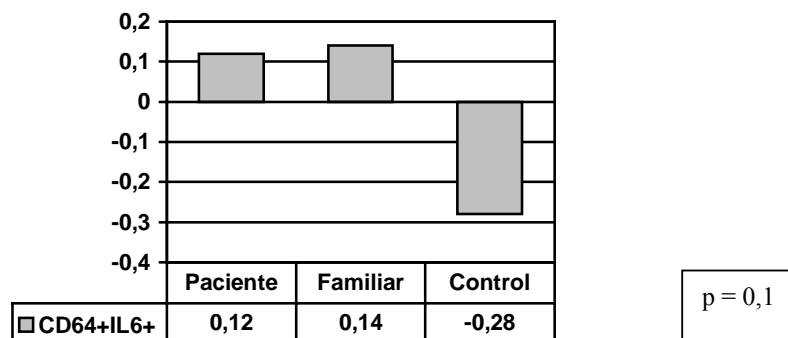


FIGURA 4.6. Descripción del porcentaje de monocitos productores de IL-6 según la forma clínica de EM (EMRR,EMSP);FS=familiar sano, CS=control sano.



No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos en la intensidad media de fluorescencia (Figura 4.7.).

FIGURA 4.7. Comparación de la intensidad media de inmunofluorescencia de IL-6 (z score) en monocitos de pacientes, familiares sanos y controles sanos



### 4.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLECULAS DE ADHESIÓN

Para analizar la expresión de moléculas de adhesión en las PBMC, se realizó la tinción de superficie con el anticuerpo monoclonal marcado correspondiente que se dejó incubar durante 30 minutos.

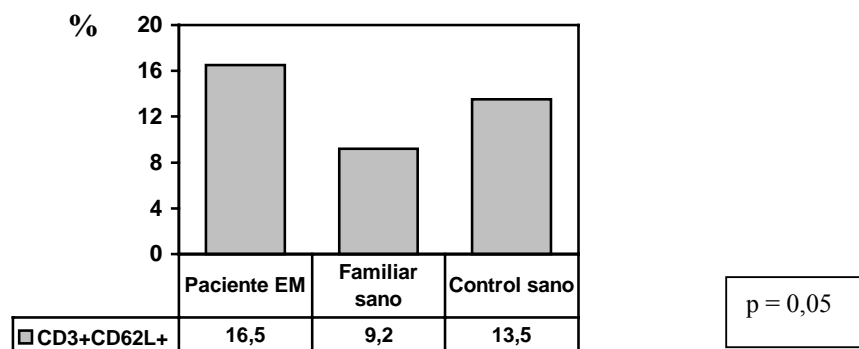
Analizamos la expresión de L-Selectina en los linfocitos T (CD3+) y en sus dos subpoblaciones CD4+ y CD8+, y en monocitos, y la comparamos entre los tres grupos.

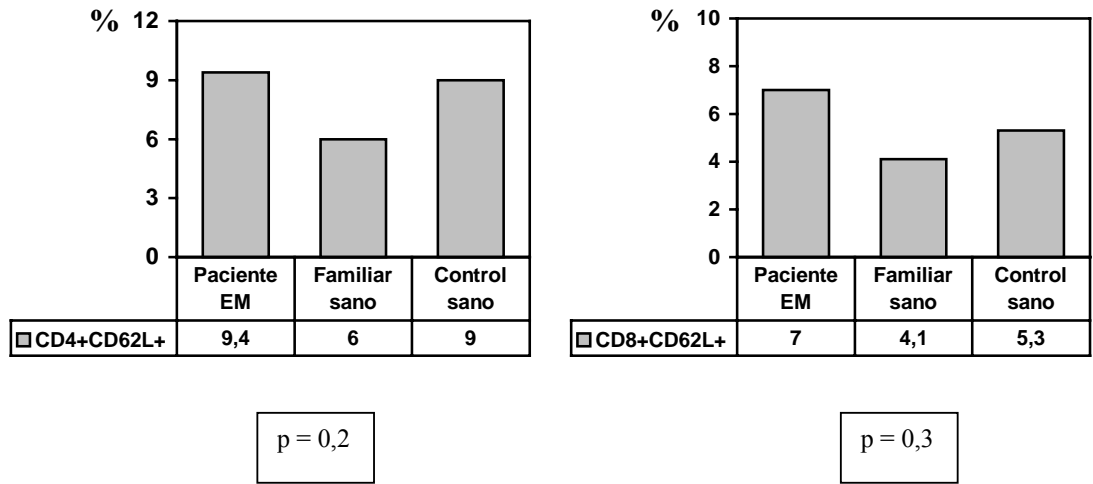
Analizamos la expresión de VLA-4 en monocitos y la comparamos entre los tres grupos.

#### 4.3.1. Análisis de la expresión de L-Selectina

El porcentaje de linfocitos T CD3+ que expresaron L-selectina (CD62L) fue superior en los pacientes EM que en los otros dos grupos de sujetos, acercándose a la significación estadística ( $p = 0,05$ ). No hubo diferencias en la expresión al analizar los linfocitos CD4+ y CD8+ por separado (Figura 4.8.).

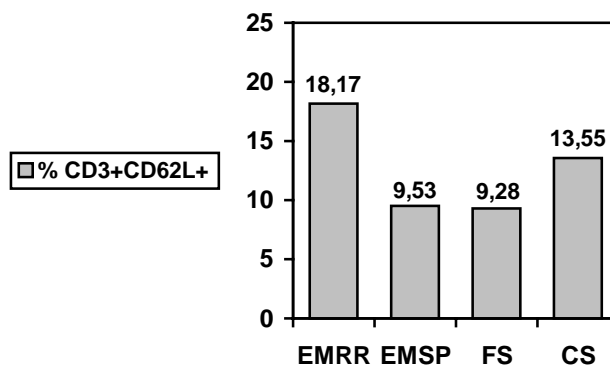
FIGURA 4.8. Comparación en el porcentaje de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ que expresan L-selectina entre pacientes, familiares sanos y controles sanos





El porcentaje de linfocitos que expresaban L-selectina en los pacientes EM fue superior en las formas RR que en las formas SP, aunque tampoco hubo diferencias comparando entre si los cuatro grupos (Figura 4.9).

FIGURA 4.9. Descripción del porcentaje de linfocitos que expresan L-selectina según la forma clínica de EM



A diferencia de lo observado en los linfocitos T, en los monocitos comprobamos que el porcentaje de células que expresaban L-selectina fue muy significativamente inferior en pacientes y sus familiares sanos que en el grupo control sano ( $p= 0,001$ ) (Figura 4.10.). En la Figura 4.11. se describen los porcentajes de monocitos que expresan L-selectina en todas las familias estudiadas. En todas ellas, la media de los valores de los pacientes y la media de los valores de los familiares sanos fueron inferiores a la media de los controles sanos. No pudimos disponer de los valores de la familia 6 por problemas técnicos.

FIGURA 4.10. Comparación del porcentaje de monocitos que expresan L-selectina entre pacientes, familiares sanos y controles sanos.

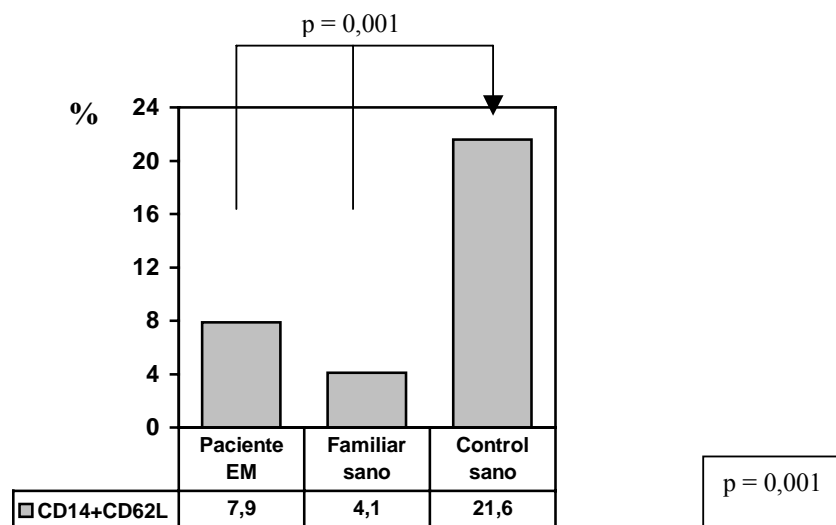
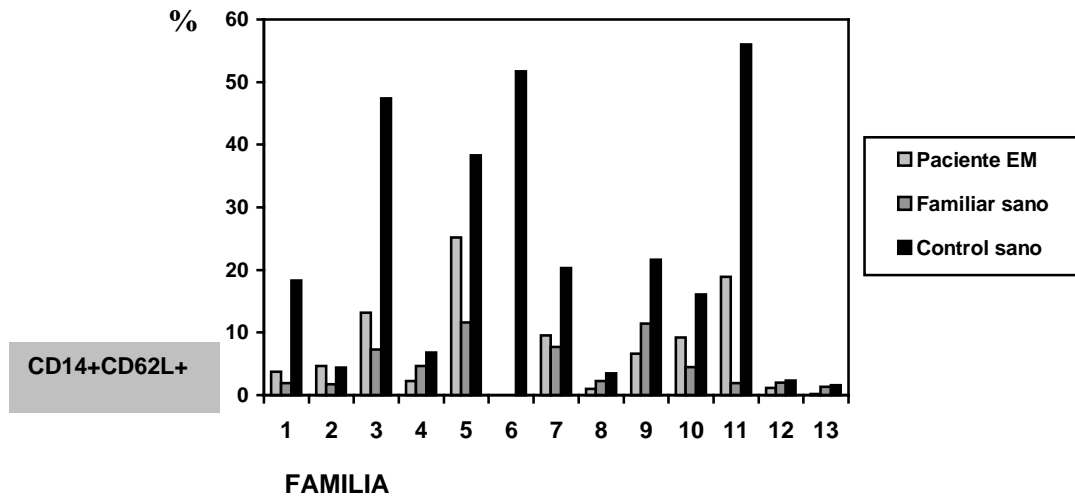
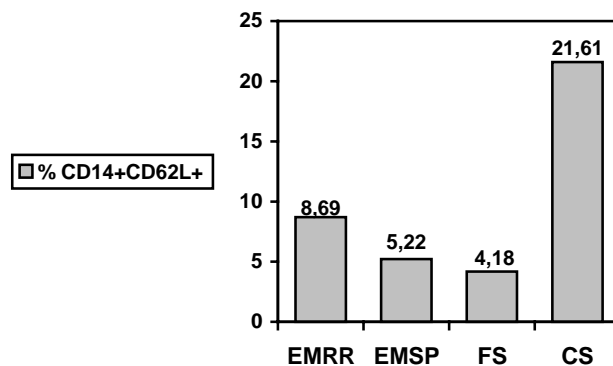


FIGURA 4.11. Descripción del porcentaje de monocitos que expresan L-Selectina en pacientes, familiares sanos y controles sanos.



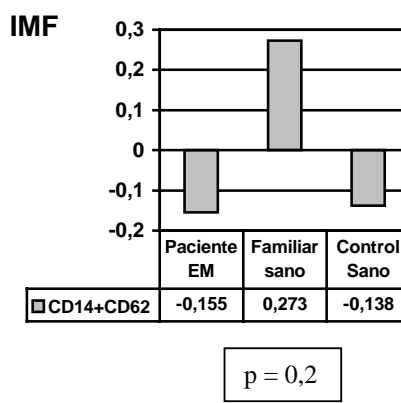
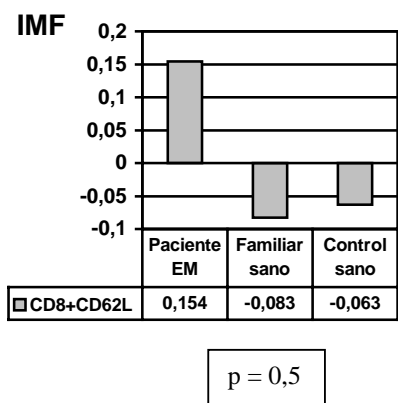
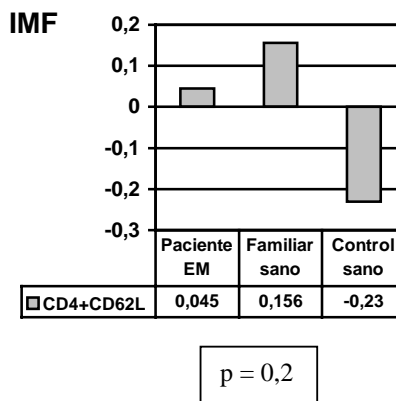
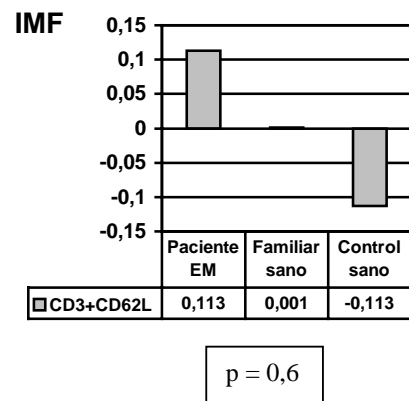
Al analizar el porcentaje de monocitos que expresaban L-selectina según la forma clínica, hallamos una expresión similar en las formas EMSP y en las EMRR (figura 4.12.).

FIGURA 4.12. Porcentaje de monocitos que expresan L-selectina según la forma clínica de EM



No hallamos diferencias en las intensidad media de inmunofluorescencia en ninguna de las poblaciones celulares analizadas (figura 4.13.)

FIGURA 4.13. Comparación en la intensidad media de fluorescencia (z score) de la L-selectina entre pacientes, familiares sanos y controles sanos en linfocitos y monocitos.



### 4.3.2. Análisis de la expresión de VLA-4

Al analizar el porcentaje de linfocitos que expresaban el complejo VLA-4 (CD29/CD49d) no hallamos diferencias entre ninguno de los tres grupos, ni en los linfocitos T (CD3+), ni en sus subpoblaciones CD4+ y CD8+ (figura 4.14.). La expresión fue similar en las dos formas clínicas de EM (figura 4.15.).

FIGURA 4.14. Comparación en el porcentaje de linfocitos CD3+ que expresan VLA-4 entre pacientes, familiares sanos y controles sanos

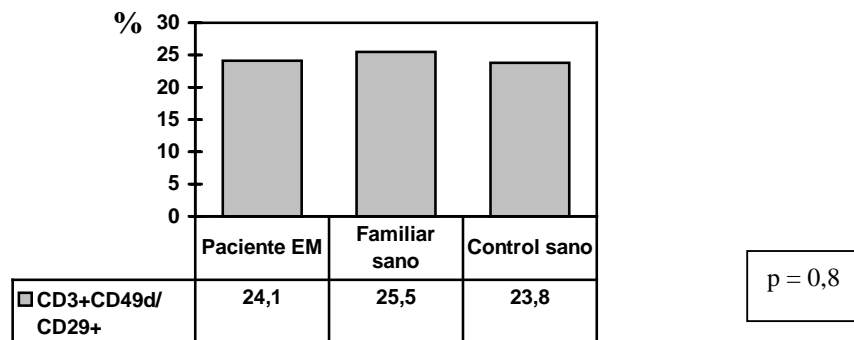
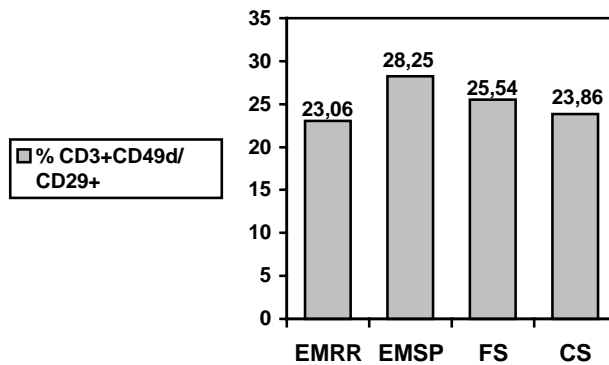


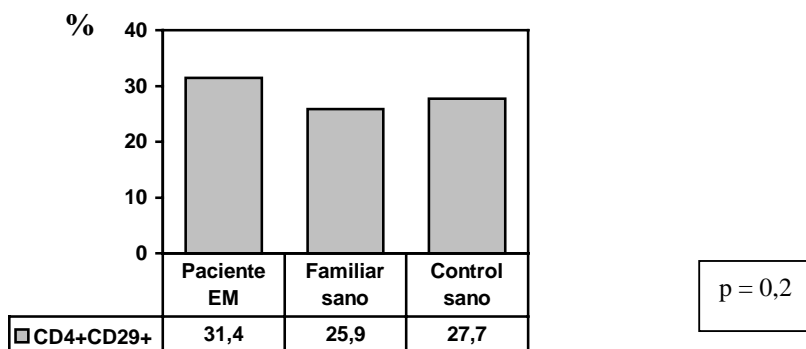
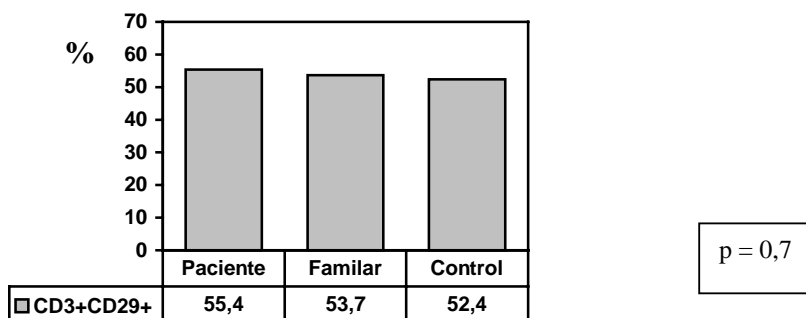
FIGURA 4.15. Comparación del porcentaje de linfocitos que expresan VLA-4 entre las dos formas clínicas de EM, familiares sanos y controles sanos





Tampoco hallamos diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos cuando analizamos las dos subunidades del complejo VLA-4 (CD29 y CD49d) por separado (Figuras 4.16. y 4.17). El porcentaje de linfocitos que expresaban cada una de las dos subunidades fue ligeramente superior en las formas SP que en las RR, pero no alcanzó significación estadística (figura 4.18.).

FIGURA 4.16. Comparación en el porcentaje de linfocitos que expresan CD29 entre pacientes, familiares sanos y controles sanos



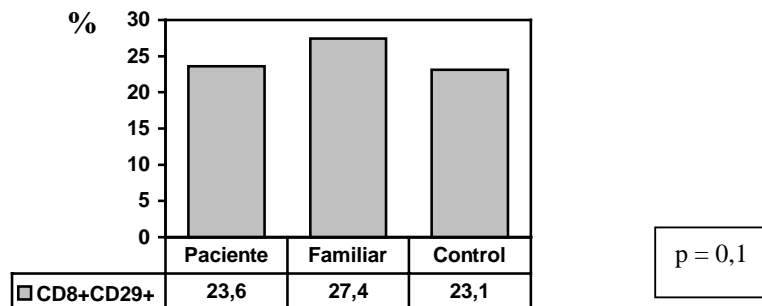
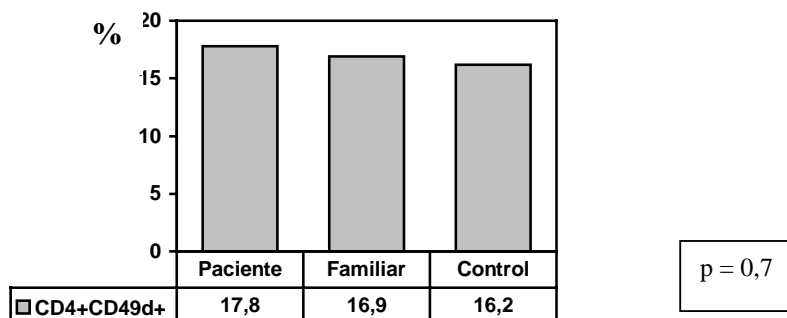
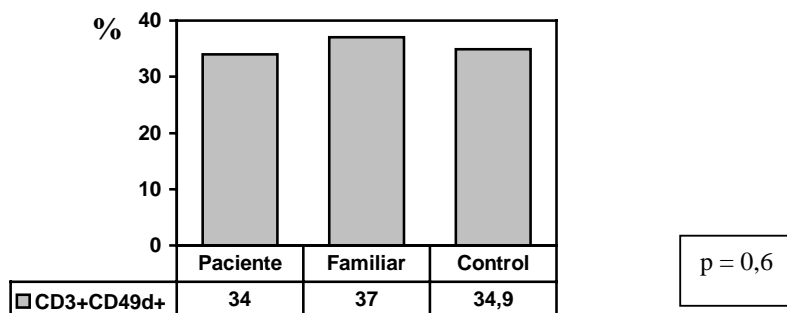


FIGURA 4.17. Comparación entre los tres grupos en el porcentaje de linfocitos que expresan CD49.



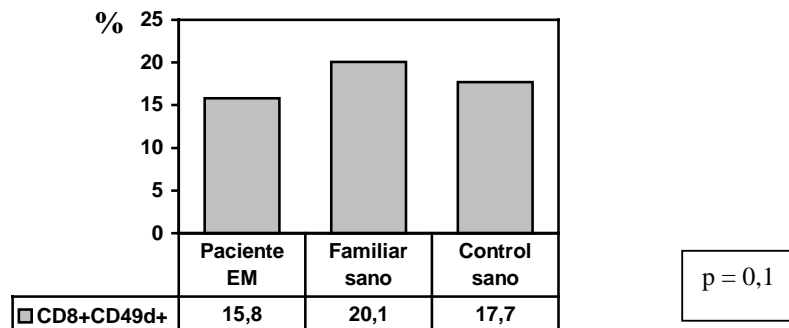
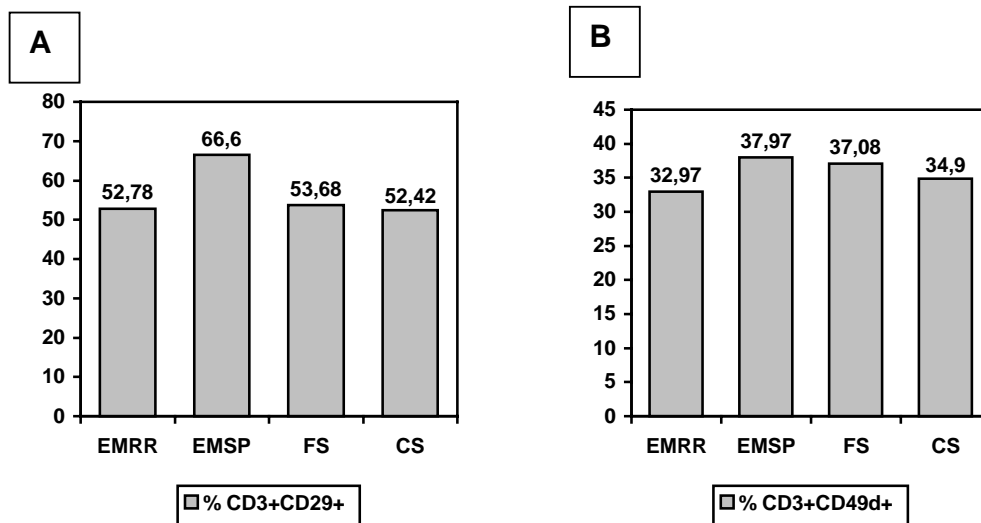


FIGURA 4.18. Porcentaje de linfocitos que expresan CD29 (A) y CD49d (B) según la forma clínica y comparación con familiares sanos y controles



La intensidad media de fluorescencia de CD29 fue significativamente más elevada en los pacientes EM que en los controles sanos, tanto en la población CD3+ ( $p=0,01$ ) como en la CD8+ ( $p=0,03$ ). No hubo, en cambio, diferencias significativas entre los pacientes y los familiares sanos, ni entre estos y los controles sanos (Figura 4.19.).

La intensidad media de fluorescencia de CD49d fue similar en los tres grupos analizados (figura 4.20.).

FIGURA 4.19. Comparación de la intensidad media de inmunofluorescencia de CD29 en linfocitos en pacientes, familiares sanos y controles sanos.

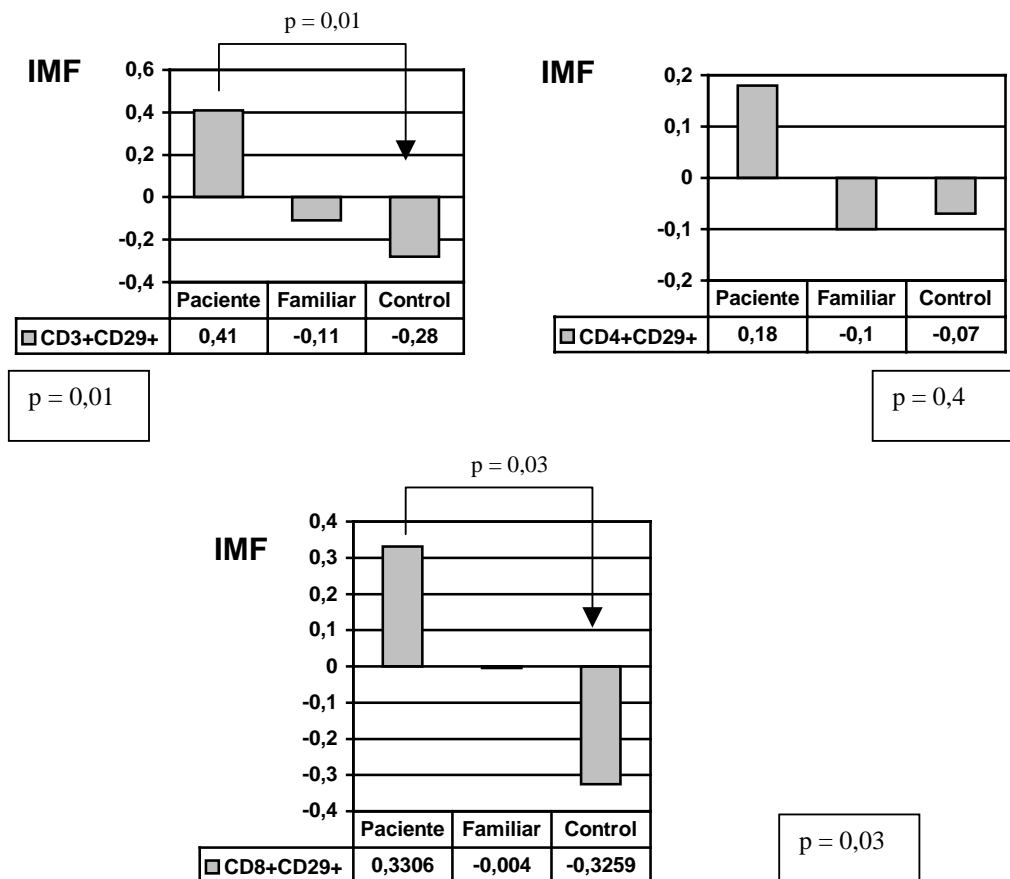
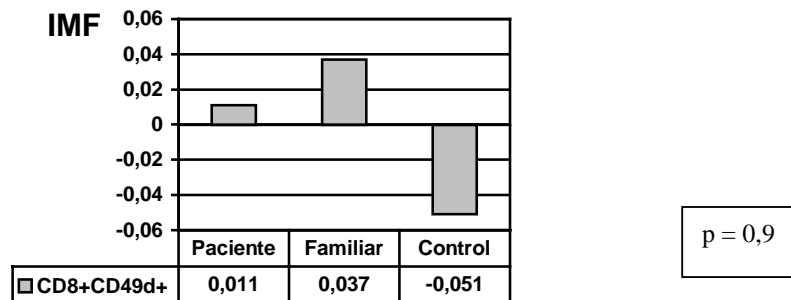
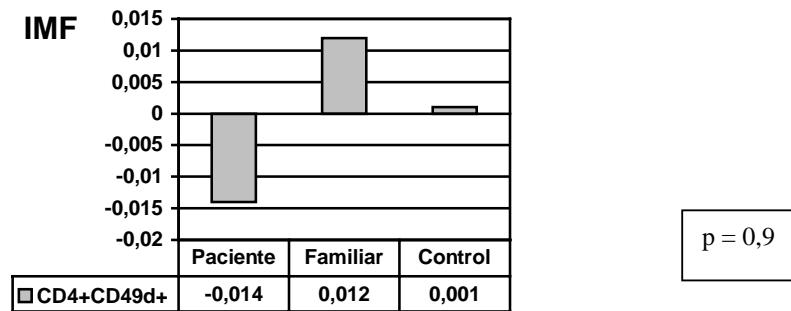
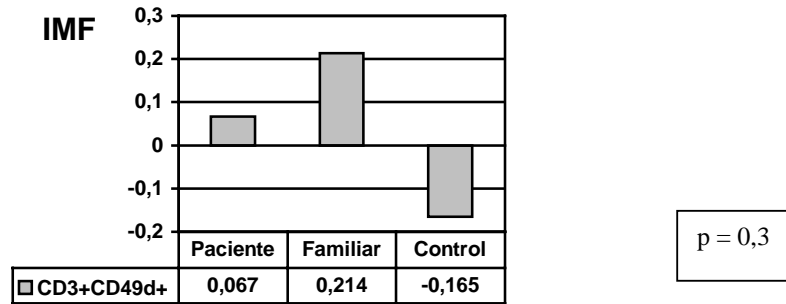


FIGURA 4.20. Comparación entre los tres grupos en la intensidad media de inmunofluorescencia (z score) del CD49.



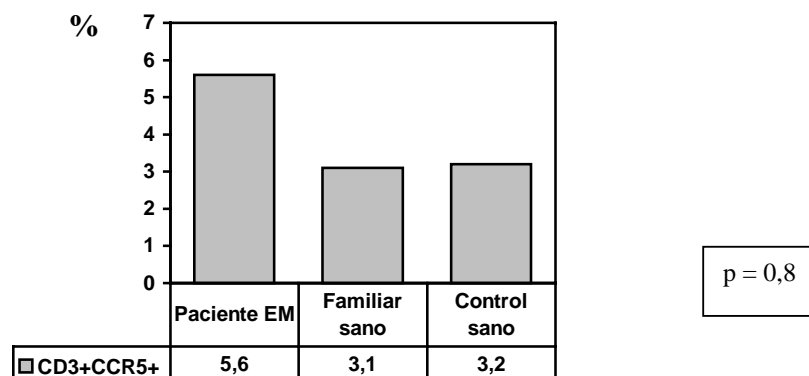
#### 4.4. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

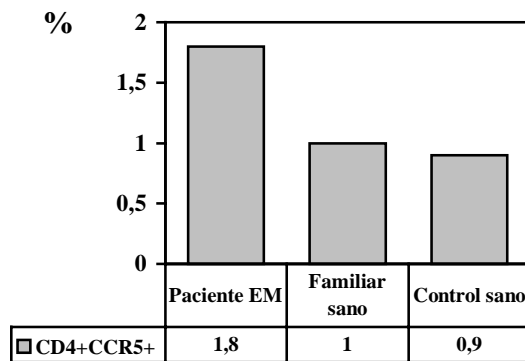
Para estudiar los receptores de quimiocinas, se incubaron las células con los respectivos anticuerpos monoclonales marcados durante 30 minutos, y se realizó el recuento celular mediante citometría de flujo. El resultado se expresó en porcentaje de linfocitos positivos para la molécula en estudio y en intensidad media de fluorescencia.

##### 4.4.1. Análisis de la expresión de CCR5

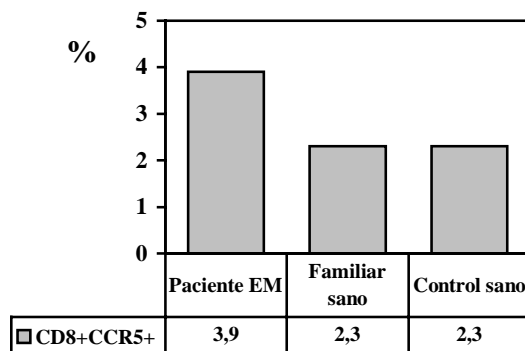
El porcentaje de linfocitos T totales (CD3+), y de sus subpoblaciones CD4+ y CD8+, que expresaban CCR5 fue superior en pacientes EM que en los otros dos grupos, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística (Figura 4.21.). Realizando el análisis según la forma clínica de EM, se observó una mayor expresión en las formas SP que en las RR, pero no hubo tampoco diferencias estadísticamente significativas (Figura 4.22.).

FIGURA 4.21. Expresión de CCR5 en linfocitos en los tres grupos de sujetos



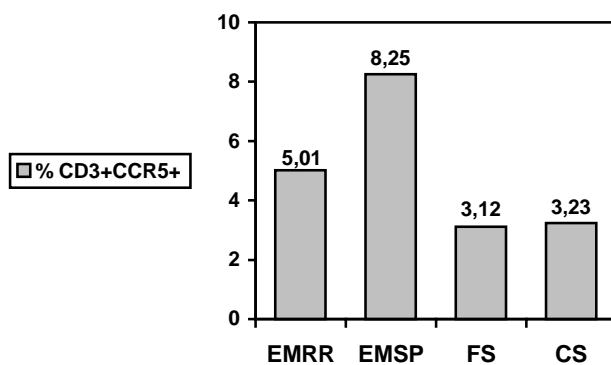


p = 0,9



p = 0,9

FIGURA 4.22. Expresión de CCR5 en linfocitos T según la forma clínica de EM



A diferencia de en los linfocitos T, en los monocitos, el porcentaje que expresaba CCR5 fue superior en controles que en los otros dos grupos, aunque tampoco alcanzó significación estadística (Figura 4.23.). No hallamos diferencias analizando la expresión según la forma clínica de EM (Figura 4.24.).

FIGURA 4.23. Comparación entre los tres grupos en el porcentaje de monocitos que expresaban CCR5.

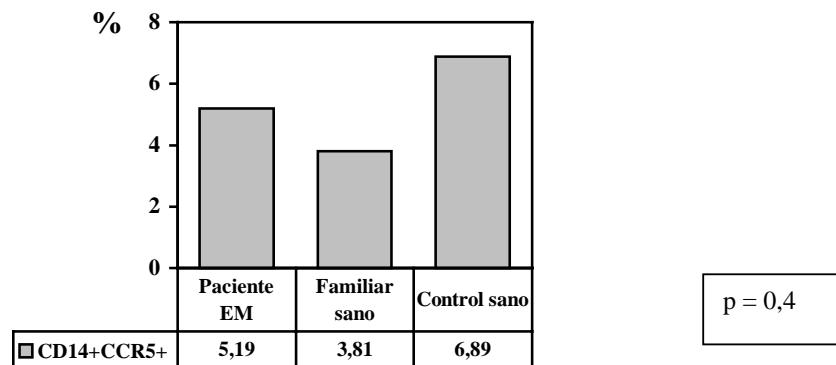
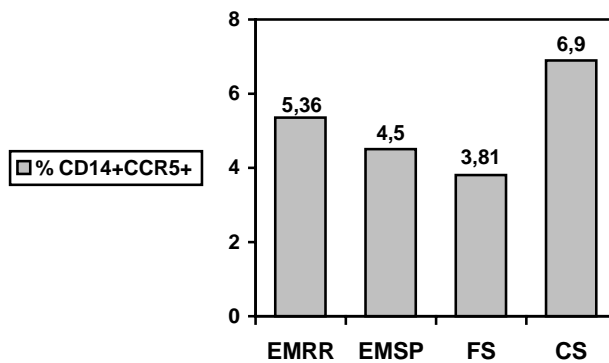


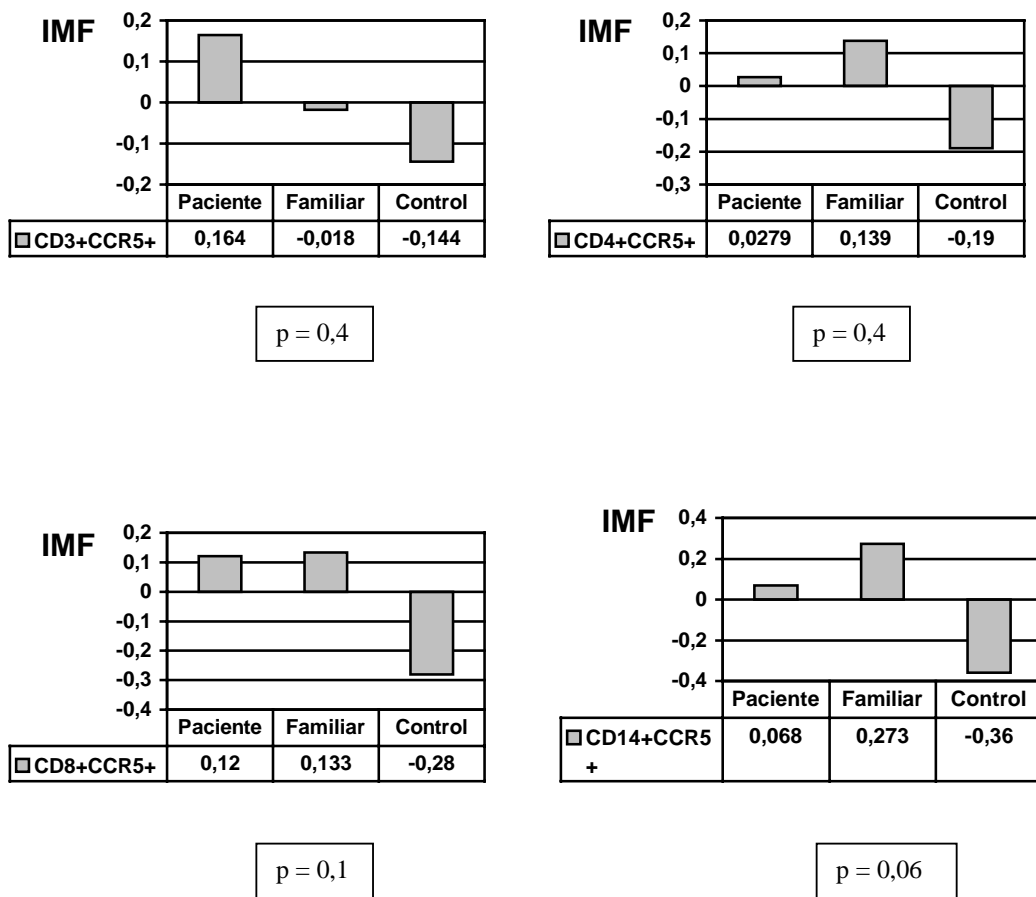
FIGURA 4.24. Comparación de la expresión de CCR5 en monocitos según la forma clínica





La intensidad media de fluorescencia del CCR5 fue mayor en los pacientes y familiares sanos que en el grupo control tanto en linfocitos como monocitos, pero en ninguna de las poblaciones leucocitarias alcanzó significación estadística (Figura 4.25.).

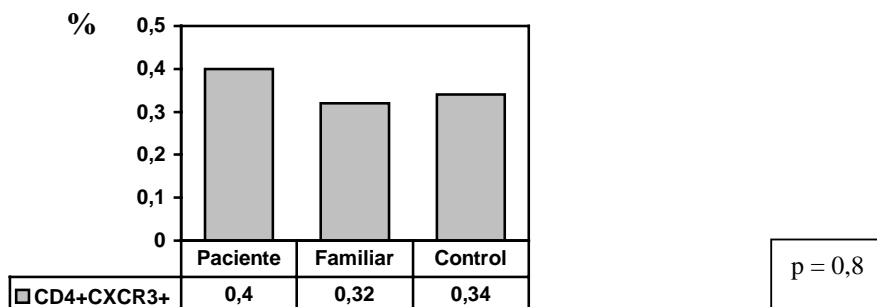
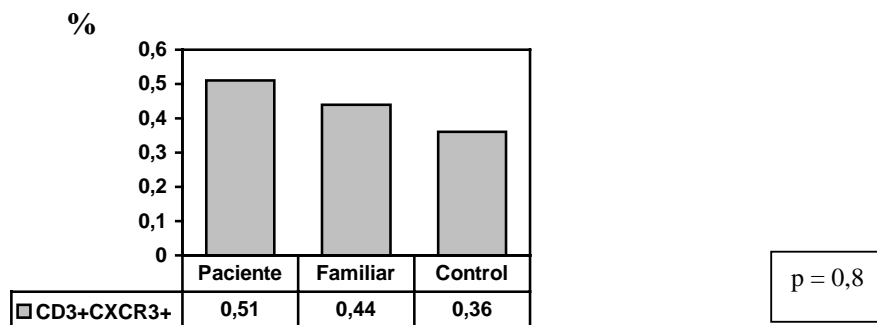
FIGURA 4.25. Comparación entre los tres grupos en la intensidad media de expresión de CCR5.

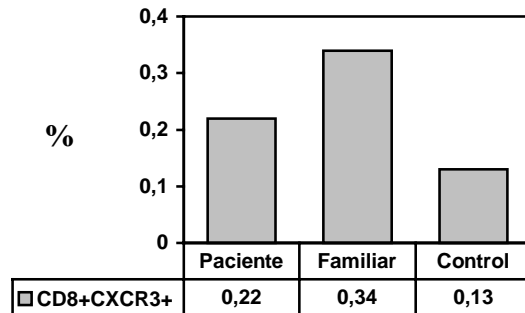


#### 4.4.2. Análisis de la expresión de CXCR3

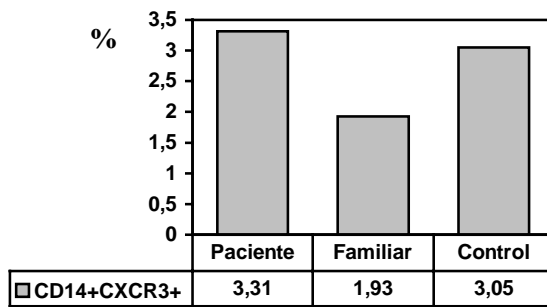
Al analizar la expresión de CXCR3 se obtuvieron unos valores muy bajos para todas las muestras. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CXCR3 ni en linfocitos T ni en monocitos (Figura 4.26.). Tampoco hallamos diferencias significativas al analizar la expresión en linfocitos y monocitos según la forma clínica de EM (Figura 4.27.).

FIGURA 4.26. Comparación entre los tres grupos en el porcentaje de expresión del CXCR3 en linfocitos y monocitos.





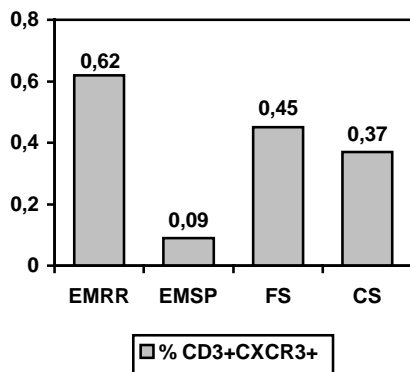
p = 0,4



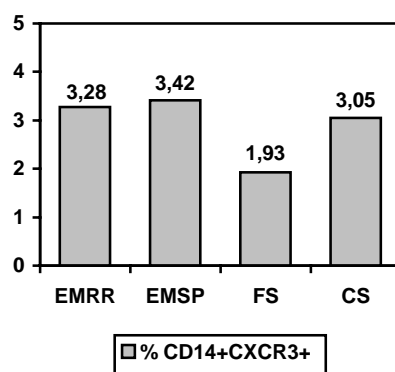
p = 0,3

FIGURA 4.27. Descripción del porcentaje de células que expresan CXCR3 en linfocitos (A) y en monocitos (B) según la forma clínica de EM

A

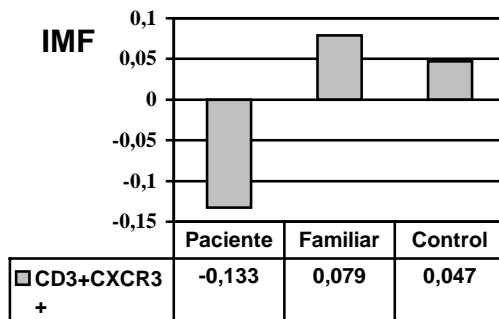


B

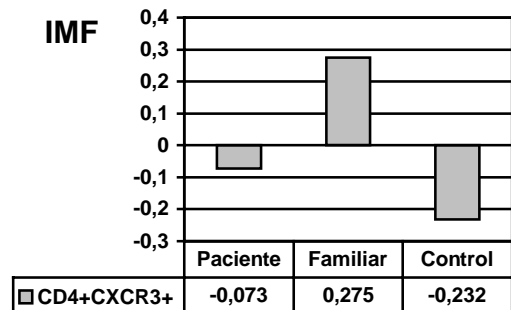


Al analizar la intensidad media de inmunofluorescencia (z score) de la expresión de CXCR3 en linfocitos y en monocitos tampoco hallamos diferencias significativas (Figura 4.28.) .

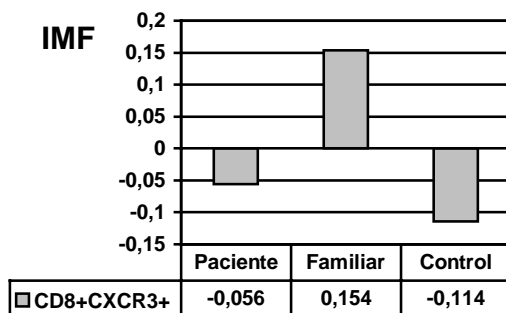
FIGURA 4.28. Comparación entre los tres grupos en la intensidad media de expresión del CXCR3.



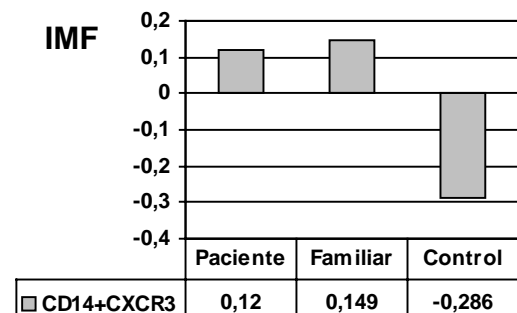
p = 0,6



p = 0,1



p = 0,5



p = 0,06

## 4.5. RESUMEN DE RESULTADOS

1. La producción de IFN-gamma por los linfocitos de sangre periférica de los pacientes con EM es similar a sus familiares sanos y, en ambos casos, significativamente superior que en la población general .
2. La producción de IL-6 por los monocitos es similar en los pacientes EM, sus familiares sanos y los controles sanos.
3. La expresión de L-Selectina en los monocitos de sangre periférica de pacientes EM es similar a sus familiares sanos y, en ambos casos, significativamente menor que en la población general.
4. La expresión de VLA-4 por los linfocitos fue similar en los tres grupos estudiados, a excepción de la IMF de la CD29 que fue significativamente más elevada en pacientes EM que en los otros dos grupos.
5. La expresión de los receptores de quimiocinas, CXCR3 y CCR5, por las células mononucleadas de sangre periférica, fue ligeramente superior en los pacientes con EM que en los otros dos grupos, pero sin alcanzar significación estadística.
6. Se observa una tendencia a una mayor producción de IFN e IL-6 en las formas SP que en las formas RR .

#### 4.6. TABLA DE RESULTADOS

POBLACIÓN CELULAR/MOLÉCULA	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA	
	PORCENTAJE	IMF
<b>CD3+IFN+</b>	<b>SI</b> <b>EM &gt; CS</b> <b>FS &gt; CS</b>	
CD4+IFN+	NO	
CD8+IFN+	NO	
CD14+IL-6+	NO	NO
CD3+CD62L+	NO	NO
CD4+CD62L+	NO	NO
CD8+CD62L+	NO	NO
<b>CD14+CD62L+</b>	<b>SI</b> <b>CS &gt; EM</b> <b>CS &gt; FS</b>	<b>NO</b>
CD3+CD29/49d+	NO	NO
<b>CD3+CD29+</b>	<b>NO</b>	<b>SI</b> <b>EM &gt; CS</b>
CD4+CD29+	NO	NO
<b>CD8+CD29+</b>	<b>NO</b>	<b>SI</b> <b>EM &gt; CS</b>
CD3+CD49d+	NO	NO
CD4+CD49d+	NO	NO
CD8+CD49d+	NO	NO
CD3+CCR5+	NO	NO
CD4+CCR5+	NO	NO
CD8+CCR5+	NO	NO
CD14+CCR5+	NO	NO
CD3+CXCR3+	NO	NO
CD4+CXCR3+	NO	NO
CD8+CXCR3+	NO	NO
CD14+CXCR3+	NO	NO

## **5. DISCUSIÓN**

## 5.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE FAMILIAR

La agregación familiar en la EM<sup>19,17,18</sup>, los conocimientos acerca de su patogenia autoinmune y la demostrada mayor incidencia de otras enfermedades autoinmunes en los familiares de primer grado de pacientes con EM<sup>213,214,215</sup>, son datos que abren un campo de estudio muy interesante. Resulta tentadora la búsqueda de aspectos inmunológicos, diferenciales o compartidos, entre los miembros sanos y enfermos de familias con EM familiar, que nos puedan ayudar en un futuro a, por un lado, comprender mejor la mayor susceptibilidad de algunas familias a padecer EM, y, por otro lado, a detectar precozmente a aquellos individuos con mayor riesgo de padecerla. Nuestros resultados contribuyen a dar respuesta a estas incógnitas.

Dos son los aspectos más destacables del presente estudio:

Por un lado, la población de pacientes sometida a investigación: 13 familias multiplex, incluyendo en cada familia el estudio de dos casos de EM emparentados entre sí, en primer o segundo grado, y la totalidad de hermanos sanos de uno de los dos pacientes. Al poder realizar la extracción de sangre de los familiares sanos en nuestra unidad, con todas las dificultades que ello implica, teniendo en cuenta que con frecuencia los familiares residían en otras provincias de España, hemos tenido información directa acerca de su estado de salud. Esto nos ha permitido descartar la existencia de síntomas pasados o presentes que sugirieran EM, otra enfermedad autoinmune o procesos inflamatorios agudos o crónicos que pudieran alterar las moléculas estudiadas.

Por otro lado, hemos investigado simultáneamente seis moléculas implicadas en diferentes pasos del proceso inflamatorio-autoinmune de la EM. Dado que las CC pro-inflamatorias son las más directamente implicadas en la patogenia de la EM, hemos seleccionado para el estudio inmunológico dos de ellas, el IFN- $\gamma$ , una molécula que ejerce una clara función pro-inflamatoria y la IL-6, una molécula con función dual, pro- y anti-inflamatoria. La elección de la L-selectina y el VLA-4 como moléculas de adhesión, la hemos basado en el diferente, y al mismo tiempo complementario, papel que juegan ambas



moléculas en la adhesión celular, la primera participando en un primer contacto con el endotelio vascular y la segunda afianzando la unión al mismo.

Dado que las células Th1 parecen ser los linfocitos más directamente implicados, hemos escogido dos receptores de QC expresadas por ellas, el CCR5 y el CXCR3.

Hasta el momento son pocos los estudios realizados que hayan investigado aspectos inmunológicos de los familiares de pacientes con EM esporádica, y, aún menos, los que han estudiado familias multiplex.

Algunos autores han analizado la frecuencia de células reactivas frente a la PBM en los familiares de pacientes con EM. Fredrikson y col.<sup>216</sup> hallaron en doce familias simplex un mismo número de células reactivas frente a PBM en los pacientes EM que en sus familiares sanos. Voskuhl y col.<sup>217</sup>, así como Joshi y col.<sup>218</sup> estudiaron una y tres familias multiplex respectivamente, y hallaron la misma frecuencia en los miembros sanos y enfermos. Por último, Martin y col.<sup>219</sup> realizaron el estudio en tres parejas de gemelos monocigotos concordantes y tres discordantes para EM, y tampoco hallaron diferencias. A diferencia de en nuestro trabajo, estos estudios carecen de un grupo control que permita saber si esta reactividad frente a PBM era mayor en los enfermos y sus familiares sanos que en la población general, ya que los estudios que han comparado la frecuencia de células reactivas frente a PMB entre pacientes EM y controles sanos no coinciden en sus resultados<sup>58,220</sup>.

Lutterotti y col.<sup>221</sup> estudiaron los niveles de anticuerpos anti-MOG y anti-PBM en pacientes EM de doce familias multiplex y sus familiares asintomáticos y los compararon con pacientes con EM esporádica y con un grupo de controles sanos. Hallaron un aumento significativo de anticuerpos anti-MOG y anti-PBM, tanto en pacientes EM como en sus familiares asintomáticos, con respecto a los controles sanos. Aún más destacable fue el hallazgo de niveles superiores de anticuerpos en los familiares sanos de las familias multiplex que en los pacientes con EM esporádica. Este dato apoyaría, al igual que los resultados de nuestro estudio, la existencia de factores inmunológicos, probablemente familiares, que pudiesen favorecer la mayor susceptibilidad del individuo perteneciente a una familia multiplex a padecer EM.

Konttinen y col. <sup>222</sup> estudiaron signos de activación linfocitaria (expresión del receptor de IL-2, secreción de IFN- $\gamma$ , síntesis de DNA y expresión del locus II del HLA) en 11 pares de gemelos, 5 monocigotos y 6 dicigotos discordantes para EM, durante fases inactivas de la enfermedad (formas crónicas progresivas y remitentes progresivas). No hallaron diferencias. Tampoco utilizaron grupo control sano sin relación familiar con los pacientes.

También hay un estudio reciente de CC en familiares sanos de pacientes con EM, pero a diferencia de nuestro estudio, en EM esporádica <sup>223</sup>. Este trabajo, realizado por Jong y col., estudió pacientes con EM esporádica y sus familiares de primer grado sanos, utilizando como grupo control los esposos de los pacientes y sus familiares de primer grado. Halló en los familiares de pacientes con EM típica (RR y SP) unos niveles séricos de IL-10 significativamente inferiores que en los controles. En cambio, tenían unos niveles séricos de TNF un 10% (no significativo) superior a la de familiares de controles. La conclusión del estudio fue que los familiares de pacientes con EM típica tienen un patrón proinflamatorio de CC, y que los miembros de familias con baja producción de IL-10 y alta de TNF tienen un riesgo aumentado en 4 veces de desarrollar EM comparado con miembros de familias con alta producción de IL-10 y baja de TNF.

Discutiremos a continuación cada uno de nuestros resultados.

## **5.2. CITOCINAS**

### **5.2.1. INF- $\gamma$**

El IFN- $\gamma$  juega un importante papel en la regulación de la respuesta inmune <sup>224</sup>. Existen evidencias que sugieren que el IFN- $\gamma$  es un mediador de la inflamación en la EM, como su capacidad para inducir la producción de otras CC pro-inflamatorias <sup>225</sup> y la expresión de moléculas HLA clase II en los monocitos/macrófagos, así como el hecho de que el

tratamiento con IFN- $\gamma$  recombinante en pacientes con EM induzca un empeoramiento de la enfermedad <sup>174</sup>.

Diversos autores han hallado en pacientes con EM un aumento de la producción de IFN- $\gamma$  por PBL precediendo al brote clínico <sup>175,176</sup>, en la EM progresiva-activa <sup>177,178,226</sup> y en la EMSP <sup>179</sup>.

En nuestro estudio hemos hallado un porcentaje de linfocitos T CD3+ productores de IFN- $\gamma$  significativamente más elevado en el global de pacientes EM que en el global de los controles sanos ( $p=0,01$ ). Observamos un valor medio de los pacientes superior al valor medio de los controles en 10 de las 13 familias estudiadas.

Es lógico pensar que, aunque la mayoría de nuestros pacientes se hallaban en una fase clínicamente inactiva, el potencial pro-inflamatorio de los linfocitos al ser estimulados perdura a lo largo del curso de la enfermedad <sup>142</sup>.

Hemos comprobado una ligera mayor producción de IFN- $\gamma$  en las formas EMSP que en las formas EMRR, observación que coincide con el estudio de Becher y col. <sup>179</sup>. Jong y col. <sup>223</sup> observaron mayores niveles de TNF- $\alpha$  en las formas de EM típica (RR y SP) que en las formas PP.

Los familiares sanos de los pacientes con EM también mostraron un aumento en la producción de IFN- $\gamma$  con respecto a los controles sanos en la mayoría de familias estudiadas (11/12; en una familia no fue valorable por no disponer de los valores de los familiares sanos por problemas técnicos), lo que hace pensar que también existe un mayor potencial pro-inflamatorio en estos sujetos. Merece la pena destacar que en tres familias la producción de IFN- $\gamma$  fue marcadamente superior en los hermanos sanos que en los pacientes. Nuestro objetivo futuro es realizar un seguimiento clínico de los familiares actualmente sanos para comprobar quienes desarrollan la enfermedad en el futuro, y comprobar si existe correlación con la elevada producción de IFN.

Nuestro resultado coincide en cierto modo con el de Jong y col. <sup>223</sup> que halla en los familiares de pacientes con EM típica (RR y SP) niveles séricos superiores de otra citocina pro-inflamatoria, el TNF, que en los familiares de los controles.

Se han llevado a cabo estudios en otras enfermedades de origen autoinmune que también demuestran similitudes en los patrones de producción de citocinas de los pacientes y sus familiares sanos. Así p.e., el estudio de Karlsson y col.<sup>227</sup> que ha analizado la producción de ARNm de IFN- $\gamma$  e IL-4, ha demostrado una mayor ratio IFN- $\gamma$ : IL-4 en familiares con elevado riesgo de desarrollar DM tipo I que en los pacientes con diabetes clínica, lo que sugiere una desviación hacia un patrón de secreción Th1 en la fase preclínica de esta enfermedad. Hussain y col.<sup>228</sup> también han demostrado una marcada hipersecreción de IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  por PBL estimuladas en los familiares de pacientes con DM I. Por otro lado, varios autores han hallado un aumento de la producción de IL-10 en pacientes con SLE y sus familiares sanos con respecto a controles sanos<sup>229,230,231</sup>.

Una cuestión que se plantea ante estos resultados es, si el aumento de producción de citocinas proinflamatorias es un fenómeno primario innato o secundario al inicio de un proceso inflamatorio aún subclínico. Un estudio de Eskdale y col.<sup>232</sup> apoya la influencia genética en el patrón de secreción de citocinas al demostrar que la capacidad de secretar IL-10 puede variar en función de la composición genética del locus de la IL-10. Por otro lado, Westendorp y col.<sup>233</sup> han hallado que un determinado patrón anti-inflamatorio de citocinas innato contribuye a presentar una enfermedad meningocócica fatal. Por el contrario, Hussain y col.<sup>228</sup> hallaron en un grupo de pacientes con DMID y sus familiares sanos niveles séricos elevados de TNF-alfa e IL-2, pero no detectaron correlación con el HLA DR. Tampoco Jong y col.<sup>223</sup> hallaron correlación entre los niveles de CC y el HLA DR2.

En el caso de nuestro estudio, al igual que en el estudio de Jong y col.<sup>223</sup>, cabe la posibilidad de que alguno de los familiares de pacientes EM padecieran una forma subclínica de la enfermedad, ya que no se les realizaron exploraciones paraclínicas. Teniendo en cuenta que el riesgo de desarrollar la enfermedad de un familiar de primer o segundo grado no supera el 3%<sup>19</sup>, este hecho no modificaría los resultados del estudio.

### 5.2.2. IL-6

La IL-6 juega un importante papel en la fase aguda de la respuesta inflamatoria, que se caracteriza por la inducción de la producción de proteínas de fase aguda. Además es importante para el desarrollo de repuestas inmunológicas específicas. Induce la diferenciación de las células B activadas culminando en la producción de Igs, estimula la proliferación de las células T tímicas y periféricas en cooperación con la IL-1, induce la diferenciación de las células T hacia células T citolíticas y activa las células NK <sup>234</sup>.

Hay datos que sugieren su papel anti-inflamatorio en la EM. En el modelo de EM inducido por el virus de la encefalitis murina, la administración de IL-6 recombinante reduce la desmielinización e inflamación de la médula espinal <sup>235</sup>. De forma similar, en la EAE la IL-6 recombinante inhibe la enfermedad <sup>236</sup>.

Por otro lado, se ha observado que los ratones "knock out" de IL-6 son resistentes a la EAE inducida con MOG <sup>199</sup>.

Algunos autores han detectado un aumento del número de monocitos secretores de IL-6 en sangre periférica de pacientes con EM <sup>204,205</sup>.

Imamura y col. <sup>206</sup> estudiaron en pacientes EM la producción de CC por monocitos estimulados con LPS, y hallaron una mayor producción de IL-6 en los pacientes en fase aguda que en los pacientes EM en remisión, pacientes con otras enfermedades neurológicas autoinmunes y no autoinmunes y controles sanos. Maimone y col. <sup>237</sup> hallaron un aumento de monocitos no estimulados productores de IL-6 en formas crónicas progresivas de EM comparado con controles.

En nuestro estudio la producción de IL-6 por los monocitos de los pacientes EM no fue significativamente diferente de la de los sujetos control. Tampoco fue diferente la producción de los hermanos sanos con respecto a los pacientes EM ni los controles sanos. Es muy probable que la ausencia de diferencias sea debida a que nosotros hemos analizado pacientes en fase inactiva de la enfermedad. Esto apoyaría el hecho de que la capacidad basal de producción de los monocitos sea la misma en los pacientes, familiares sanos y controles, y que únicamente aumenta en fases de actividad, entendiendo tanto formas RR

en brote como formas SP. Otro dato que apoya esta hipótesis es que observamos una marcada mayor producción de IL-6 en las formas secundariamente progresivas comparado con las formas remitentes-recurrentes.

### **5.3. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN**

#### **5.3.1. L-Selectina**

Las selectinas, L, P y E, son glicoproteínas transmembrana que median el rodar de los leucocitos sobre las células endoteliales microvasculares. Este fenómeno se ha observado tanto en linfocitos y neutrófilos como en monocitos <sup>238</sup>.

Mediante la utilización del AcMo MEL14, se ha demostrado que la L-selectina esta implicada en la migración de los neutrófilos hacia el tejido inflamado <sup>239,240</sup>. También la administración de AcMo anti-L-selectina ha demostrado bloquear in vitro la adhesión de los monocitos al endotelio desde un 30% <sup>241</sup> hasta un 87% <sup>242</sup>, probablemente dependiendo del activador del endotelio utilizado en el experimento.

Otro dato que apoya la potencial importancia de la L-selectina en la EM, viene dado por la demostración de que la administración de un Ac monoclonal anti-L-selectina suprime en las ratas Lewis la EAE inducida mediante sensibilización a la MBP e inhibe levemente la EAE inducida por transferencia de céls T específicas frente a MBP <sup>68</sup>.

En nuestro estudio, no hallamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la L-selectina en los linfocitos T de los tres grupos de sujetos estudiados. En cambio, pudimos observar una clara menor expresión de L-selectina por los monocitos de los pacientes EM y sus familiares sanos, con respecto al grupo control sano. Esta diferencia fue estadísticamente muy significativa ( $p=0,001$ ). El porcentaje medio de monocitos de los controles que expresaban L-selectina fue superior al porcentaje medio de los pacientes y al porcentaje medio de los familiares sanos en 11 de las 12 familias estudiadas (en la familia 6 no se pudieron analizar ni los pacientes ni los familiares sanos por problemas técnicos).

Nuestros resultados están de acuerdo con numerosos estudios de la L-selectina en diferentes enfermedades de patogenia autoinmune como la artritis reumatoide, la enfermedad de Graves, la diabetes tipo I, la psoriasis y la esclerosis sistémica, que demuestran una disminución de la expresión de la L-selectina en linfocitos y/o monocitos de los pacientes comparado con los controles, así como un aumento de los niveles séricos de su forma soluble<sup>243,244,245,246</sup>.

La disminución de la expresión de la L-selectina en los monocitos de nuestros pacientes y familiares sanos, podría obedecer a una mayor liberación de la misma de la superficie celular. No hemos realizado la determinación de su forma soluble, lo que nos podría haber ayudado a confirmar esta posibilidad. En otro estudio reciente realizado en nuestro laboratorio<sup>144</sup>, se demostraron mayores niveles séricos de L-selectina soluble en pacientes que en controles sanos.

La primera vez que se demostró la rápida pérdida de la L-selectina de la superficie celular fue tras la estimulación de neutrófilos con factores quimiotácticos<sup>247</sup>. Posteriormente, se comprobó que la pérdida de la L-selectina de la superficie celular se producía por escisión proteolítica en el dominio extracelular de la molécula<sup>248</sup>. Estudios posteriores demostraron que la selectina no sólo se escinde cuando la célula es activada, sino también tras el tratamiento con reactivos que reaccionan de forma cruzada con la L-selectina<sup>249</sup>, antiinflamatorios no esteroideos<sup>250</sup>, o concentraciones elevadas de proteína C reactiva<sup>251</sup>.

El papel fisiológico de la rápida escisión de la L-selectina aún no se conoce completamente. Se ha comprobado que la escisión proteolítica de la L-selectina modula la velocidad del rodar de los leucocitos sobre las células endoteliales<sup>521</sup>. Por otro lado, se ha propuesto que la pérdida de la L-selectina permite a los leucocitos desprenderse de la superficie luminal de la pared vascular e iniciar la migración entre las células endoteliales y a través de la pared del vaso hacia el tejido subyacente<sup>247</sup>. El estudio fenotípico de las células T capaces de realizar la migración transendotelial también ha demostrado que hay menor proporción de células que expresan L-selectina<sup>253,254</sup>, lo que podría indicar que las

células que alcanzan el lugar de inflamación son las células que tras la adhesión al endotelio han perdido la selectina de su superficie.

La selectina soluble también es funcionalmente activa y puede inhibir la unión de los leucocitos al endotelio <sup>255</sup>. En adultos sanos cuyos leucocitos de sangre periférica no han demostrado ningún signo obvio de activación, la L-selectina soluble está presente en plasma. Se cree que la continua liberación de L-selectina durante el rodar fisiológico de los leucocitos es un posible origen de la L-selectina en el plasma de adultos sanos <sup>252</sup>.

En nuestro estudio, como hemos comentado previamente, la significativa menor expresión de la L-selectina en pacientes y familiares sanos, ha sido exclusivamente evidente en la población de monocitos, y no en linfocitos. Esto podría sugerir que en situación basal, los monocitos presentan ya cierto grado de activación en pacientes y familiares. Cabe recordar que los monocitos aumentan la expresión endotelial de MA y favorecen la migración transendotelial de los linfocitos T <sup>256</sup>. Por otro lado, los macrófagos predominan sobre las células T en las placas de EM, y puede que sean las primeras células presentes en la EM aguda <sup>257</sup>.

En conclusión, en nuestro estudio se ha podido comprobar la menor expresión de L-selectina en los monocitos de pacientes con EM y sus familiares sanos, con respecto a los controles. Ello podría deberse a una mayor escisión de la L-selectina de la superficie celular por un aumento de la proteólisis, bien por inducción directa por alguna molécula sérica, o bien, por un aumento del rodar de los monocitos sobre el endotelio. En este último caso, también podría jugar un papel la mayor producción de IFN-gamma, ya que éste induce la expresión de ICAM-1 en el endotelio vascular, y se ha podido comprobar que esta molécula actúa sinérgicamente con la L-selectina en el rodar de los leucocitos sobre el endotelio <sup>258</sup>.

### **5.3.2. VLA-4**

El VLA-4, o integrina alfa-4 beta-1, se encuentra en los leucocitos activados, se adhiere a la fibronectina a través de su segmento conector CS-1 y al endotelio vascular a



través de la molécula de adhesión celular vascular -1 (VCAM-1). La VLA-4 es crucial para que los linfocitos T penetren en el tejido cerebral <sup>259</sup>, por lo que es un factor patogénico muy importante, y la administración de AcMo anti - la cadena alfa 4 (CD49d) o beta 1(CD29) del VLA-4 bloquean completamente la migración de los monocitos inducida por C5a en endotelio activado con L1-alfa, TNF-alfa o LPS <sup>260</sup>.

En nuestro estudio, los porcentajes de linfocitos que expresaron VLA-4, o sus dos subunidades CD29 y CD49d analizadas por separado, fueron muy similares en pacientes, hermanos sanos y controles; no hubo diferencias estadísticamente significativas. Este hecho podría ser debido a que los pacientes sometidos a estudio se hallaban en una fase inactiva de la enfermedad. Un estudio previo reciente realizado en nuestra unidad <sup>261</sup> sí demostró un aumento de células CD4+CD49d+ en sangre periférica de pacientes con EMRR, pero los pacientes estudiados se hallaban en brote.

Por otro lado, sí hallamos una mayor IMF de CD29 en linfocitos CD3+ de los pacientes con respecto a los otros dos grupos, siendo la diferencia estadísticamente significativa respecto a los controles sanos ( $p=0,01$  para CD3+). La mayor expresión en los linfocitos CD3+ vino marcada por la mayor expresión en su subpoblación CD8+ ( $p=0,03$ ). La IMF de la subunidad CD49d del complejo VLA-4 fue, en cambio, similar entre los tres grupos. Este resultado podría deberse al aumento de expresión de otras integrinas, como el VLA-5 y VLA-6, de las que la el CD29 también es parte constituyente.

Algunos estudios han demostrado un aumento de la proporción de linfocitos en sangre periférica que expresan VLA-4 y LFA-1, tanto en EMRR como EMSP <sup>141,142</sup>. Contrastando con estos resultados, otros autores, o no han hallado diferencias <sup>145,146,147</sup>, o, por el contrario han comprobado en los pacientes EMRR una menor expresión de VLA-4 y VLA-5, así como de su subunidad beta común, CD29 <sup>143</sup>. Stuber y col. <sup>146</sup> analizaron en un estudio longitudinal los patrones de expresión de VLA-4 y LFA-1 en CD4+, que no cambiaron significativamente a lo largo de 6 meses, aunque los pacientes mostraron actividad en la RMN.

Existen pues, resultados muy discordantes en los estudios realizados hasta el momento sobre la molécula VLA-4 en la EM. Teniendo en cuenta el demostrado papel que

juega esta molécula de adhesión en la patogenia del proceso inflamatorio, debería esperarse un aumento de su expresión en los pacientes con respecto a los controles. En nuestro estudio, esto sólo se ha cumplido para la expresión de la subunidad beta 1. El grupo de hermanos sanos mostró una expresión no significativamente diferente a los pacientes ni a los controles sanos.

## **5.4. RECEPTORES DE QUIMIOCINAS**

### **5.4.1 CCR5**

La interacción de las quimiocinas con sus respectivos receptores de superficie media el reclutamiento de subpoblaciones leucocitarias concretas hacia el lugar de inflamación <sup>281</sup>. Diferentes estudios han demostrado la expresión de diferentes quimiocinas y sus receptores en diferentes fases de las lesiones de EM <sup>116,263,119,73</sup>.

En nuestro estudio hemos hallado una mayor expresión de CCR5 en los linfocitos CD3+ (CD4+ y CD8+ )en pacientes con EM que en el grupo de controles sanos, aunque no ha alcanzado diferencia estadísticamente significativa. El grupo de familiares sanos ha mostrado una producción similar al grupo control sano. No ha habido tampoco diferencias en la expresión en la población de monocitos.

Otros autores han demostrado un aumento de la expresión de CCR5 en linfocitos de sangre periférica en pacientes EM en brote <sup>73,264</sup> y de CCR5 y CXCR3 en linfocitos de pacientes con formas progresivas de EM <sup>111</sup>. Un estudio previo realizado en nuestro laboratorio <sup>118</sup> halló una mayor expresión de CCR5 en CD4+ y CD8+ en los pacientes EM. En este estudio se incluyeron formas EMPP, que mostraron mayor porcentaje de células CD4+CCR5+ que las formas EMRR o EMSP.

También se ha demostrado que la producción de RANTES, un ligando del CCR5, está aumentada en la EM-RR comparado con controles, sobre todo durante fases activas de la enfermedad <sup>115</sup>.

Sorensen y col.<sup>73</sup> hallaron en los pacientes EM en fase activa un aumento en la frecuencia de células T del LCR que expresaban el CXCR3 y CCR5, comparado con sangre periférica. De forma similar, y en otra patología inflamatoria de mecanismo autoinmune como es la artritis reumatoide, Quin y col.<sup>265</sup> demostraron en el líquido sinovial de un paciente que de los linfocitos T, un 97% eran CXCR3+ y un 80% CCR5+, frente a un 35% y 15% respectivamente en sangre periférica. Estos hallazgos podrían sugerir que ambas QC marcan las subpoblaciones linfocitarias con capacidad para migrar a los lugares de inflamación.

No se ha podido demostrar hasta el momento en familias multiplex relación entre los genes que codifican los receptores de algunas QC y la incidencia de la enfermedad en los miembros de las familias<sup>266</sup>.

En conclusión, el CCR5 parece ver aumentada su expresión en fases de inflamación activa de la EM (RR en brote o formas progresivas), cuando los linfocitos T son reclutados hacia el lugar de inflamación. En nuestro estudio, en el que la mayoría de pacientes padecían formas RR y se hallaban en fase de remisión, la expresión fue superior en los pacientes EM, probablemente indicando cierto grado de inflamación activa, aunque sin alcanzar significación con respecto a los otros dos grupos. La expresión en los familiares sanos fue similar al grupo control. Teniendo en cuenta estos resultados, cabría concluir que el CCR5 actuaría más como un marcador de actividad de la enfermedad que de susceptibilidad.

### **5.4.2 CXCR3**

El CXCR3 está altamente expresado en linfocitos T activados con IL-2, pero no en linfocitos T, células B, monocitos o granulocitos no activados<sup>95</sup>. El CXCR3 se une a las quimiocinas IP-10 y Mig, que están inducidas por el IFN-gamma<sup>267</sup>. La respuesta a IP-10 y Mig, junto a la expresión de los ligandos para la E- y P-selectina<sup>268</sup>, favorece

probablemente la migración de las células Th1 y Th0 al lugar de la reacción inflamatoria dominada por la producción de IFN-gamma<sup>269</sup>.

En nuestro estudio los pacientes EM mostraron una ligera mayor expresión de CXCR3, tanto en linfocitos CD3+ como en CD4+ como en monocitos, pero en ningún caso significativa. Este hecho podría deberse nuevamente a que la mayoría de pacientes se hallaban en una fase inactiva de la enfermedad, lo que también explicaría los bajos niveles de CXCR3 detectados.

Balashov y col.<sup>111</sup> demostraron que tanto las células CD3+CCR5+ como las células CD3+CXCR3+, se hallaban elevadas en sangre periférica en la EM progresiva ( $P < 0.005$ ), y que el porcentaje de células T CXCR3+ también estaba aumentado en la EM RR ( $P < 0.05$ ) comparado con controles. En cambio, Sorensen y col.<sup>73</sup> no hallaron diferencias en el porcentaje de CD4+ o CD8+ que expresaban CXCR3 entre pacientes EM en fase activa y controles sanos. En cambio, sí hallaron un elevado porcentaje de células positivas para los receptores CCR5 y CXCR3 en el LCR de los pacientes. Este dato, junto a la indemnidad de la BHE en el 95% de los pacientes, sugiere que la mayor expresión es debida a la síntesis local en el SNC y no a la difusión de células positivas desde la sangre periférica.

## **6. CONCLUSIÓN**

Las conclusiones que podemos obtener de los resultados de este estudio son las siguientes:

1. La producción de IFN- $\gamma$ , un potente inmunomodulador, es más elevada en los pacientes EM y los familiares sanos de las familias multiplex que en los controles sanos, lo que sugiere la existencia de un mayor potencial pro-inflamatorio, no sólo en los sujetos con EM, sino también en los miembros que no padecen la enfermedad clínica.
2. La expresión de la L-selectina en los monocitos, es inferior en los pacientes y los familiares sanos de las familias multiplex que en los controles sanos, lo que sugiere, que los miembros que no padecen la enfermedad clínica también presentan un mayor grado de activación de esta población celular, tan importante en el inicio del proceso inmunopatogénico de la EM.
3. Estos hallazgos apoyan la existencia de cambios inmunológicos comunes a todos los miembros de las familias multiplex, que pueden ser signo de la mayor susceptibilidad a padecer EM.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Charcot JM. Histologie de la sclerose en plaques. Gazette Hospital (Paris). 1868; 41:554-566.
2. Raine CS, Cross AH. Axonal dystrophy as a consequence of long-term demyelination. Lab Invest 1989;60:714-725.
3. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. N Engl J Med 1998; 338:278-85.
4. Adams CW, Poston RN, Buk SJ. Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. J Neurol Sci 1989; 92:291.
5. Prineas JW, Raine CS. Electron microscopy and immunoperoxidase studies of early multiple sclerosis lesions. Neurology 1976;26:29-32.
6. Prineas JW. The neuropathology of multiple sclerosis. In Koetsier JC(de): Handbook of Clinical Neurology, vol 47, Demyelinating Diseases. Elsevier, New York, 1985;213-257.
7. Luchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. Brain Pathol 1996;6(3):259-274.
8. Targett MP y col. Failure to achieve remyelination of demyelinated rat axons following transplantation of glial cells obtained from the adult human brain. Neuropathol Appl Neurobiol 1996, 22:199-206.



9. O.Fernández. Esclerosis Múltiple. Fundación Española de Esclerosis Múltiple, Málaga 2000. AltaGraphics.
10. Smith C, Scheinberg L. Clinical features of multiple sclerosis. *Sem Neurol* 1995;(5):85-93
11. Miller A. Clinical features. In S. Cook (Ed.), *Handbook of multiple sclerosis*. NY: Marcel Dekker, 1990:169-186.
12. Martyn C. The epidemiology of multiple sclerosis. In W. Matthews, A. Compston, Allen, IV, C. Martyn, & McAlpine's (Eds.), *Multiple sclerosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1991:3-40.
13. Hader WJ, Elliot M, Ebers GC. Epidemiology of multiple sclerosis in London and Middlesex County, Ontario, Canada. *Neurology* 1988; 38(4):617-621.
14. Charcot JM. Des formes frustes de la sclérose en plaques. *Progrès Médical* 1892 ;1 :399-419.
15. Eichorst H. Über infantile und hereditäre Multiple Sklerose. *Virchow s Arch. Path Anat* 1886;146:173-92.
16. McAlpine D, Compston ND, Lumsden CE. *Multiple Sclerosis*. Edinburgh: E & S Livingstone, 1995.
17. Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH. MS:update risks for relatives. *Am J Med Genet* 1988;29(3) :533-41.

18. Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC, y col. Effect of age at onset and parental disease status on sibling risks for MS. *Neurology* 1998;50:719-123.
19. Robertson NP, Fraser M, Deans J, y col. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with MS. *Brain* 1996;119:449-455.
20. Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC;The Canadian Collaborative Study Group. *Neurology* 2001;56(6): 784-5.
21. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46(4): 907-911.
22. Thompson AJ, Kermode AG, MacManus DG, y col. Patterns of disease activity in multiple sclerosis: a clinical and magnetic resonance imaging study. *BMJ* 1990;300:631-634..
23. Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, y col. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1997; 120:1085-1096.
24. Stevenson VL, Miller DH, Rovaris M, y col. Primary progressive and transitional progressive multiple sclerosis: a clinical and MRI cross sectional study. *Neurology* 1999; 52:1-7.
25. Thompson AJ, Montalbán X, Barkhof B, y col. Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis: a position paper. *Ann Neurol* 2000, 47(6):831-5

26. Weinshenker BG, Bulman D, Carriere W, y col. A comparison of sporadic and familial MS. *Neurology* 1990;40:1354-58.
27. Robertson NP, Clayton D, Fraser M, y col. Clinical concordance in sibling pairs with MS. *Neurology* 1996 ;47 :347-352.
28. Trojano M, Liguori M, De Robertis F, y col. Comparison of clinical and demographic features between affected pairs of Italian MS Multiplex families; relation to TNF genomic polymorphisms. *J Neurol Sci* 1999;162(2):194-200.
29. Chataway J, Mander A, Robertson N, y col. MS in sibling pairs: an analysis of 250 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:757-761.
30. Granieri E, Casetta I. Selected Reviews.Common childhood and adolescent infections and multiple sclerosis. *Neurology* 1997;49(Suppl 2):S42-S54.
31. Herndon, RM. Herpesviruses in Multiple Sclerosis. *Arch Neurol* 1996;53(2):123-124.
32. Huang LM y col. Meningitis caused by human herpesvirus-6. *Arch Dis Child* 1991;66:1441-1443.
33. Ishiguro N y col. Meningo-encephalitis associated with HHV-6 related exanthem subitum. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:987-989.
34. Wakefield D y col. Human herpesvirus 6 and myalgic encephalomyelitis.*Lancet* 1988;(i):1065-1067.

35. Kondo K, Nagafugi H, Sakaguchi AY, Naylor SL. Association of human herpesvirus 6 infection of the CNS with recurrence of febrile convulsions. *J Infect Dis* 1993;167:1197-1200.
36. Simmons A. Herpesviruses and Multiple Sclerosis. *Herpes* 2002;8: 60-63.
37. Sumaya CV, Myers LW, Ellison GW, Ench Y. Increased prevalence and titer of Epstein-Barr virus antibodies in patients with MS. *Ann Neurol* 1985;17(4) :371-7.
38. Woyciechowska JL, Dambrozia J, Leinikki P. Viral antibodies in twins with MS. *Neurology* 1985;35(8) :1176-80.
39. Kinnunen E, Valle M, Piirainen L, y col. Viral antibodies in MS. A nationwide co-twin study. *Arch Neurol* 1990;47(7).743-6.
40. Bergkvist M, Sandberg-Wollheim M. Serological differences in monozygotic twin pairs discordant for MS. *Acta Neurol Scand* 2001;104:262-265.
41. Weinshenker BG. Epidemiology of MS. En Riggs JF ed. *Neurologic Clinics: Neuroepidemiology*. Philadelphia, Saunders 1996;14:291-308.
42. Fernández O. Factores genéticos y ambientales en la EM. *Rev Neurol* 2000; 30(10):964-967.
43. Kurtzke JF. Epidemiology of multiple sclerosis. In Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL, eds. *Handbook of clinical neurology*. Vol.3. Amsterdam: Elsevier; 1985: 259-87.
44. Sadovnick Ad, Ebers GC. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can J Neurol Sci* 1993; 20:17-29.

45. Ebers GC, Sadovnick AD. The role of genetic factors in MS susceptibility. *J Neuroimmunol* 1994;54(1-2):1-17.
  46. Sadovnick AD, Baird PA. The familial nature of MS: age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology* 1988;38(6):990-991.
  47. Sadovnick AD, Ebers GC. Genetics of Multiple Sclerosis. In: *Neurologic Clinics of North America* (Antel J ed):Philadelphia: W.B.Saunders Company;1995:99-118.
  48. Ebers GC, sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in MS. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 1995;377(6545):150-151.
  49. Sadovnick AD, Ebers GC, Dymment DA, Risch NJ. Evidence for genetic basis of MS. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 1996;347(9017):1728-1730.
  50. Marrosu MG, Muntoni F, Murru MR, y col. Role of predisposing and protective HLA DQA and DQB alleles in Sardinian MS. *Arch Neurol* 1993;50:256-260
  51. Uría DF. HLA y EM. Estudios en la población española. *Rev Neurol* 2000;31(11):1066-1070.
  52. Oksenberg JR, Hauser SL. New insights into the immunogenetics of MS. *Curr Opin Neurol* 1997;10:181-5.
  53. Hillert J. Progresos recientes en la Genética de la Esclerosis Múltiple. *Cuadernos de Esclerosis Múltiple* 2000; 6:8-19.
- RU:
- a) Sawcer y col. A genome screen in MS reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet* 1996; 13(4):464-468.
- USA:
- b) Ebers y col. A full genome search in MS. *Nat Gen* 1996; 13(4):472-476.
- CAN:

- c) Haines y col. A complete genome screen for MS underscores a role for de major histocompatibility complex : the MS Genetics Group. *Nat Genet* 1996; 13(4):469-71.

FIN:

- d) Kuokkanen y col. Genomewide scan of MS in Finnish mutiplex families. *Am J Hum Genet* 1997; 61(6):1379-1387.
- e) Kuokkanen y col. A putative vulnerability locus to MS maps to 5p14-p12 in a region syntenic to the murine locus Eae2. *Nat Genet* 1996; 13(4):477-480.
- f) Tienari y col. Genetic susceptibility to MS linked to myelin basic protein gene. *Lancet* 1992; 340 (8826):987-991.

ITAL:

- g) D'Alfonso y col. Linkage analysis of MS with candidate region markers in Sardinian and Continental Italian families. *Eur J Hum Genet* 1999; 7(3): 377-385.

SCAND:

- h) Oturai y col. Linkage and association analysis of susceptibility regions on chromosomes 5 y 6 in 106 scandinavian sibling pair families with MS. *Ann Neurol* 1999; 46(4):612-616.
- i) Fogdell y col. Linkage analysis of HLA class II genes in Swedish multiplex families with MS. *Neurology* 1997; 48(3):758-762.
- j) Xu y col. Linkage and association in MS with markers in 12p13 and 7q35:syteny with experimental autoimmune disease loci.
- k) Dai y col. Linkage analysis suggests a gene with importance in MS in 3p14-13.
- l) Larsen y col. Linkage analysis of a candidate region in Scandinavian sib pairs with MS reveals linkage to chromosome 17q.
- m) Xu y col. Association and linkage analysis of candidate chromosomal regions in MS: indication of disease genes in 12q23 and 7ptr-15. *Eur J Hum Genet* 1999; 7(2):110-116.

54. Adams CW, Poston RN, Buk SJ. Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute MS. *J Neurol Sci* 1989;92:291.

55. Hickey W. Migration of hematogenous cells through the blood brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Path* 1991;1:97-105.

56. Rolak LA. Multiple Sclerosis. En Rolak LA, Harati Y, eds. *Neuroimmunology for the clinician*. Newton: Eds Butterworth-Heinemann 1997;107-132.

57. Sun JB, Olson T, Wang WZ, y col. Autoreactive T and B cells responding to proteolipid protein in MS. *J Immunol* 1991;21:1461-1464.

58. Chou YK, Bourdette DN, Offne H, y col. Frequency of T-cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and CSF in MS. *J Immunol* 1992;38:105-108.

59. Reinhert EL, Weiner HL, Hauser SL, y col. loss of supressor T-cells in active MS. N Engl J Med 1980;303:125-131.
60. Hafler DA, Fox DA, Manning ME, y col. In vivo activated T lymphocytes in the peripheral blood and CSF of patients with MS. N Eng J Med 1985;312:1405-1409.
61. Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J y col. Animal models (review). Ann Neurol 1994;36(Suppl):S47-S53.
62. Wucherpfennig K, Strominger J. Molecular mimicry in T-cell mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. Cell 1995;80:695-706.
63. Padovan E, Casorati G, Dellabona P, Meyer S, Brockhaus M, Lanzavecchia A. Expression of two cell receptor  $\alpha$  chains: dual receptor T cells. Science 1993;262:422-424.
64. Davodeau F, Peyrat MA, Romagné F, y col. Dual T cell receptor  $\beta$  chain expression on human T lymphocytes. J Exp Med 1995;181:1391-1398.
65. Padovan E, Giachino C, Cella M, Valitutti S, Acuto O, Lanzavecchia A. Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor  $\beta$  chains: amplifications for the mechanism of allelic exclusion. J Exp Med 1995;181:1587-1591.
66. Heininger K, Schafer B, Hartung HP, Fierz W, Linington C, Toyka KV. The role of macrophages in experimental autoimmune neuritis induced by a P2-specific T-cell line. Ann Neurol 1988;23(4):326-31.
67. Fleischer B. Superantigens (review). APMIS 1994;102:3-12.

68. Archelos JJ, Jung S, Rinner W, Lassmann H, Miyasaka M, Hartung HP. Role of the leukocyte-adhesion molecule L-selectin in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 1998;159(2):127-34.
69. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992; 356(6364):63-6.
70. Wisniewski HM y Lossinsky AS. Structural and functional aspects of the interaction of inflammatory cells with the blood-brain barrier in experimental brain inflammation. *Brain Path* 1991;1:89-96.
71. Hayashi M, Luo Y, Laning J y col. Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines in murine glial cells. *J Neuroimmunol* 1995;60:143-150.
72. Tani M, Ransohoff RM. Do chemokines mediate inflammatory cell invasion of the central nervous system parenchyma?. *Brain Path* 1994;4:135-143.
73. Sorensen TL, Tani M, Jensen J, y col. Expression of specific chemokine receptors in the CNS of MS patients. *J Clin Invest* 1999;103(6):807-815.
74. Van der Voorn P, Tekstra J, Beelen RHJ, y col. Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating MS lesions. *Am J Pathol* 1999;154(1):45-51.
75. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple Sclerosis: Current Pathophysiological Concepts. *Lab Invest* 2001; 81(2):263-281.



76. Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow derived and present antigen in vivo. *Science* 1988;239:290-292.
77. Vass K, Lassmann H, Wekerle H, Wisniewski HM. The distribution of Ia-antigen in the lesions of rat acute EAE. *Acta neuropathol* 1986;70:149-160.
78. Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, y col. CD40-CD40 ligand interactions in EAE and MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1996; 93:2499-2504.
79. Canella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of MS lesions. *Ann Neurol* 1995; 37:424-435.
80. Olsson T. Immunology of MS. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1992;5:195-199
81. Dubois-Dalcq M, Niedieck B, Buyse M. Action of anti-cerebroside sera of myelinated nervous tissue cultures. *Pathologia Europea* 1970;5:331-347.
82. Bansil S, Troiano R, Rohowsky-Kochan C, y col. MS: pathogenesis and treatment. *Sem Neurol* 1994;14:146-152.
83. Mauerhoff T, Pujol-Borrell R, Mirakian R, Bottazzo GF. Differential expression and regulation of MHC products in neural and glial cells of the human foetal brain. *J Neuroimmunol* 1988;18:271-289.
84. Raine CS. The Dale E. Mcfarling Memorial Lecture: the immunology of MS lesion. *Ann Neurol* 1994;36:S61-S63.

85. Freedman MS, Ruijs TCG, Selin LK, Antel JP. Peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells lyse fresh human brain-derived oligodendrocytes. *Ann Neurol* 1991; 30:794-800.
86. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in MS brain. *J Exp Med* 1989;170(2):607-612.
87. Bansil S, Cook SD, Rohowsky-Kochan C. MS: immune mechanism and update on current therapies. *Ann Neurol* 1995;37:S87-S93.
88. Selmaj KW, Raine CS, Farooq M, et al. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes: apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 1991; 147:1522-1527.
89. Scolding NJ, Morgan BP, Houston A, Campbell AK, Linington C, Compston DAS: Normal rat serum cytotoxicity against syngeneic oligodendrocytes. Complement activation and attack in the absence of anti-myelin antibodies. *J Neurol Sci* 1989;89(2-3):289-300.
90. Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in MS lesions. *J Clin Invest* 1991;87:949-954.
91. Shields DC, Banik NL. Pathophysiological role of calpain in experimental demyelination. *J Neurosci Res* 1999;55:533-541.
92. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, et al. International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev* 2000, 52(1):145-187.
93. Karpus WJ, Ransohoff, RM. Cutting Edge Commentary: Chemokine Regulation of Experimental Allergic Encephalomyelitis: Temporal and Spatial Expression Patterns Govern Disease Pathogenesis. *J Immunol* 1998;161:2667-2671

94. Murphy PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on Chemokine Receptor Nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54(2):227-229.
95. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000;95(10):3032-3043
96. Sallusto F, Lenig D, Mackay CHR, Lanzavecchia A. Flexible programs of Chemokine Receptor Expression on Human Polarized T Helper 1 and 2 Lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187 (6): 875-883.
97. Bonecchi R, Bianchi G, y col. Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;187 (1): 129-134.
98. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into de CNS. *J Neurosci Res* 1991;28(2):254-260.
99. Kuchroo VK, Martin CA, Greer JM, y col. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1993; 151:4371.
100. Godiska R, Chantry D, Dietsch GN, y col. Chemokine expression in murine experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1995;58:167.
101. Hulkower K, Brosnan CF, Aquino A, Cammer W, y col. Expression of CSF-1, c-fms and MCP-1 in the CNS of rats with EAE. *J Immunol* 150:2525.

- 102.Miyagishi R, Kikuchi S, Takayama C, y col. Identification of cell types producing RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta in rat experimental autoimmune encephalomyelitis by in situ hybridization. *J Neuroimmunol* 1997; 77(1):17-26.
- 103.Karpus WJ, Lukacs NW, McRae BL, y col. An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1 alpha in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1995;155(10):5003-10.
- 104.Karpus WJ, Kennedy KJ. MIP-1 alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol* 1997;62(5):681-7.
- 105.Rottman JB, Slavin AJ, Silva R, y col. Leucocyte recruitment during onset of EAE is CCR1 dependent. *Eur J Immunol* 2000;30(8):2372-7.
- 106.Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, y col. CCR2 is critical for induction of EAE. *J Exp Med* 2000;192(6):899-905.
- 107.Izikson L, Klein RS, Charo IF, y col. *J Exp Med* 2000;192(7):1075-80.
- 108.Miyagishi R, Kikuchi S, Fukazawa T, Tashiro K. Macrophage inflammatory protein-1 alpha in the CSF of patients with MS and other inflammatory neurological diseases.*J Neurol Sci* 1995;129(2):223-7.
- 109.Mahad DJ, Howell SJ, Woodroffe MN. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72(4):498-502.

110. Scarpini E, Galimberti D, Baron P, y col. IP-10 and MCP-1 levels in CSF and serum from multiple sclerosis patients with different clinical subtypes of the disease. *J Neurol Sci* 2002;195(1):41-6.
111. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, y col. CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in MS and their ligands MIP-1 $\alpha$  and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Immunology* 1999;96(12):6873-6878.
112. Strunk T, Bubel S, Mascher B, y col. Increased numbers of CCR5+interferon- $\gamma$ -and tumor necrosis factor- $\alpha$ -secreting T lymphocytes in MS patients. *Ann Neurol* 2000;47(2):269-73.
113. Martínez-Cáceres EM, Espejo C, Brieva L, y col. Expression of chemokine receptors in the different clinical forms of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2002;8:390-395.
114. Sorensen TL, Sellebjerg F. Selective suppression of chemokine receptor CXCR3 expression by interferon- $\beta$ 1a in MS. *Mult Scler* 2002, 8:104-107.
115. Iarlori C, Reale M, Lugaresi A, y col. RANTES production and expression is reduced in RRMS patients treated with interferon- $\beta$ -1b. *J Neuroimmunol* 2000;107:100-7
116. McManus C, Berman JW, Brett FM, y col. MCP-1, MCP-2 y MCP-3 expression in MS lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol* 1998, 1; 86(1)20-9.
117. Hvas J, McLean C, Justesen J, y col. Perivascular T cells express the pro-inflammatory chemokine RANTES mRNA in MS lesions. *Scand J Immunol*, 1997; 46:195.

- 118.Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, y col. Expression of the beta-chemokine receptors CCR3,CCR3 y CCR5 in MS CNS tissue. *J Neuroimmunol* 2000;1;108(1-2):192-200.
- 119.Simpson JE, Newcombe J, Cuzner ML, Woodrooffe MN. Expression of the interferon- $\gamma$ -inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in MS lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000,26(2):133-42.
- 120.McMurray RW. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1996;25(4):215-233.
- 121.Grewal IS, Foellmer HG, Grewal KD, y co. CD62L is required on effector cells for local interactions in the CNC to cause myelin damage in EAE. *Immunity* 2001;14(3):291-302.
122. Graesser D, Mahooti S, Haas T, y col. The interrelationship of alpha 4 integrin and matrix metalloproteinase-2 in the pathogenesis of EAE. *Lab Invest* 1998;78:1445-1458.
- 123.van der Laan LJ, van der Goes A, Wauben MH, y col. Beneficial effect of modified peptide inhibitor of alpha4 integrins on EAE in Lewis rats. *J Neurosci Res* 2002; 67(2):191-9.
- 124.Kent SJ, Karlik SJ, Cannon C, y col. A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active EAE. *J Neuroimmunol* 1995;58:1-10.
- 125..Piraino PS, Yednock TA, Freedman SB, y col. Prolonged reversal of chronic experimental allergic encephalomyelitis using small molecule inhibitor of alpha4integrin. *J Neuroimmunol* 2002;131(1-2):147-59.

126. Tubridy N, Behan PO, Capildeo R, y col. The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. *Neurology* 1999; 53(3):466-72.
127. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, y col. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2003;348(1):15-23.
128. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 1991;65:961-971.
129. Huitinga I, Damoiseaux JG, Döpp EA, Dijkstra CD. Treatment with anti-CR3 antibodies ED7 and ED8 suppresses EAE in Lewis rats. *Eur J Immunol* 1993;23:709-715.
130. Gordon EJ, Myers KJ, Dougherty JP, Rosen H, Ron Y. Both antiCD11a (LFA-1) and anti-CD11b (MAC-1) therapy delay the onset and diminish the severity of EAE. *J Neuroimmunol* 1995;62:153-160.
131. Sobel RA, Mitchell ME, Frondren G. ICAM-1 in cellular immune reactions in the human CNS. *Am J Pathol* 1990; 136:1309-1316.
132. Washington R, Burton J, Todd RF, y col. Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated CNS vessels from patients with MS. *Ann Neurol* 1994; 35:89-97.
133. Brosnan CF, Cannella B, Battistini L, Raine CS. Cytokine localization in MS lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology* 1995; 45:S16-S21.

134. Bo L, Peterson JW, Mork S, et al. Distribution of immunoglobulin family members ICAM-1, -2, -3 and the  $\beta$ 2 integrin LFA-1 in MS lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:1060-1072.
135. Moingeon P, Chang HC, Wallner BP, et al. CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function. *Nature* 1989;339:312-314.
136. Damle NK, Aruffo A. VCAM-1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991;88:6403-6407.
137. Damle NK, Klussman K, Leytze G, et al. Costimulation with integrin ligands ICAM-1 or VCAM-1 augments activation-induced death of antigen-specific CD4-T lymphocytes. *J Immunol* 1993;151:2368-2379.
138. Frohman EM, Frohman TC, Dustin ML, et al. 1989. The induction of ICAM-1 expression on human fetal astrocytes by interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , lymphotoxin and IL-1: relevance to intracerebral antigen presentation. *J Neuroimmunol* 1989; 23:117-124.
139. Shrikant P, Chung IY, Ballestas M, Benveniste EN. Regulation of ICAM-1 gene expression by TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  and interferon- $\gamma$  in astrocytes. *J Immunol* 1994; 151:209-220.
140. Shrikant P, Weber E, Jilling T, Benveniste EN. ICAM-1 gene expression by glial cells: differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6. *J Immunol* 1995;155:1489-1501.
141. Elovaara I, Lalla M, Spare E, et al. Methylprednisolone reduces adhesion molecules in blood and CSF in patients with MS. *Neurology* 1998; 51(6):1703-8.



142. Elovaara I, Ukkonen M, Leppäkynnäs M, y col. Adhesion Molecules In MS. Relation to Subtypes of Disease and Methylprednisolone Therapy. *Arch Neurol* 2000;57:546-551.
143. Sveningsson A, Hansson GK, Andersen O, y col. Adhesion molecule expression on CSF T lymphocytes: evidence for common recruitment mechanisms in MS, aseptic meningitis, and normal controls. *Ann Neurol* 1993;34(2):155-161.
144. Durán I, Martínez-Cáceres EM, Ríó J, y col. Immunological profile of patients with primary progressive MS. Expression of adhesion molecules. *Brain* 1999;122:2297-2307.
145. Luján S, Masjuan J, Roldán E, y col. The expression of integrins on activated T-cells in MS. Effect of intravenous methylprednisolone treatment. *Mult Scler* 1998;4:239-242.
146. Stüber A, Martin R, Stone LA, y col. Expression pattern of activation and adhesion molecules on peripheral blood CD4+ T lymphocytes in RRMS patients: a serial analysis. *J Neuroimmunol* 1996;66:147-151.
147. Droogan AG, Crockard AD, McMillan SA, Hawkins SA. Effects of intravenous methylprednisolone therapy on leukocyte and soluble adhesion molecule expression in MS. *Neurology* 1998;50(1):224-9.
148. Calabresi PA, Pelfrey CM, Tranquill LR, y col. VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of MS with interferon- $\beta$ . *Neurology* 1997;49:1111-1116.

149. Muraro PA, Leist T, Bielekova B, McFarland HF. VLA-4/CD49d downregulated on primed T lymphocytes during interferon- $\beta$  therapy in MS. *J Neuroimmunol* 2000; 111(1-2):186-94.
150. Sveningsson A, Dotevall L, Stemme S, y col. Increased expression of B2-7 costimulatory molecule on CSF cells of patients with MS and infectious CNS disease. *J neuroimmunol* 1997; 75:59-68.
151. Hartung HP, Reiners KH, Archelos JJ, y col. Circulating adhesion molecules and TNF receptors (60 kDa) in MS: correlation with MRI and comparison with viral encephalitis. *Ann Neurol* 1995;38: 186-193.
152. Mössner R, Fassbender K, Kühnen J, y col. Circulating L-selectin in MS patients with active, gadolinium-enhancing brain plaques. *J Neuroimmunol* 1996;65:61-65.
153. Celada A. *Inmunología básica*. Ed Labor, Barcelona, 1994:435-438.
154. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Fctional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793.
155. Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, y col. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med* 1996, 184(2):473-483.
156. Fukara H, Kent SC, Pietruszewicz MJ, y col. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in MS patients. *J Clin Invest* 1996;98:70-77.

- 157.Constant SL, Bottomly K .Induction of Th1 and Th2 CD4+Tcell responses. Ann Rev Immunol 1997;15:297-322.
- 158.O'Garra A.Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity 1998;8:275-283.
- 159.Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 1996;17:138-145.
- 160.Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. Immunol Today 1995;16:34-38.
- 161.Hartung, HP, Kieseier BC. Inmunología Clínica de la Esclerosis Múltiple. Cuadernos de Esclerosis Múltiple 1999; 3: 8-25.
- 162.Sharief MK. Cytokines in multiple sclerosis: pro-inflammation or pro-remyelination? Multiple Sclerosis 1998;4:169-173.
- 163.Weinberg AD, Wyrick G, Celnik B, Vainiene M, Bakke A, Offner H, Vandenbark AA. Lymphokine mRNA expression in the spinal cord of Lewis rats with EAE is associated with a host recruited CD45R<sup>hi</sup> / CD4+ population during recovery. J Neuroimmunol 1993;48:105-117.
- 164.Issazadeh S, Mustafa M, Ljungdahl A, y col. IFN- $\gamma$ , IL-4 and TGF- $\beta$  in EAE in Lewis rats:dynamics of cellular mRNA expression in the CNS and lymphoid cells. J Neurosci Res 1995;40:579-590.
- 165.Trotter JL, Collins KG, van der Venn RC. Serum cytokine levels in chronic progressive MS:IL-2 levels paralell TNF- $\alpha$  levels. J Neuroimmunol 1991;33:29-36.

- 166.Sharief MK, Hentges R. Association between Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and disease progression in patients with Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1991;325(7):467-72.
- 167.Hauser SL, Doolittle TH, Lincoln R, y col. Cytokine accumulation in CSF of MS patients:frequent detection of IL-1 and TNF but not IL-6. *Neurology* 1990;40:1735-1739.
- 168.Rudick RA, Ransohoff RM. Cytokine secretion by MS monocytes. Relationship to disease activity. *Arch Neurol* 1992;49:265-270.
- 169.Windhagen A, Nicholson LB, Weiner HL, y col. Role of Th1 and Th2 cells in neurologic disorders. *Chem Immunol* 1996;63:171-186.
- 170.Van der Laan LJ, Ruuls SR, Weber KS, y col. Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of TNF- $\alpha$  and nitric oxide. *J Neuroimmunol* 1996;70:145-152.
- 171.Mokhatarian F, Shi Y, Shirazian D, y col. Defective production of antinflammatory cytokine TGF- $\beta$  by T cell lines from patients with active MS. *J Immunol* 1994;152:6003-6010.
- 172.Falcone M, Bloom BR. A T helper cell 2 (Th2) immune response against non-self antigens modifies the cytokine profile of autoimmune T cells and protects against EAE. *J Exp Med* 1997;185:901-907.
- 173.Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K. IFN- $\gamma$ -induced oligodendrocyte cell death: Implications for the pathogenesis of MS. *Mol Med* 1995;1:732-742.

174. Panitch HS, Hirsch L, Schindler J, Johnson KP. Treatment of MS with gamma interferon: Exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 1987;37:1097-1102.
175. Beck J, Rondot P, Catinot L, y col. Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol Scand* 1988; 78:318-323.
176. Dettke M, Scheidt P, Prange H, Kirchner H. Correlation between IFN production and clinical disease in patients with MS. *J Clin Immunol* 1997;17(4):293-300.
177. Inogés S, Merino J, Bandres E, y col. Cytokine flow cytometry differentiates the clinical status of MS patients. *Clin Exp Immunol* 1999;115(3):521-5.
178. Comabella M, Balashov K, Issazadeh S, y col. Elevated IL-12 in progressive MS correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy. *J Clin Invest* 1998;102(4):671-8.
179. Becher B, Giacomini PS, Pelletier D, y col. IFN- $\gamma$  secretion by peripheral blood T-cell subsets in MS: correlation with disease phase and IFN- $\beta$  therapy. *Ann Neurol* 1999;45:247-250.
180. Link H, Sun JB, Wang ZY, y col. Virus-reactive and autoreactive T cells are accumulated in CSF in MS. *J Neuroimmunol* 1992;78:63-73.
181. Link H. The cytokine storm in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 1998;4:12-15.
182. Traugott U, Lebon P. MS: Involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann Neurol* 1988;24:243-251.

- 183.Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in MS lesions. *J Clin Invest* 1991;87:949-954.
- 184.Tsukada N, Miyagi K, Matsuda M, y col. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the CSF and sera of patients wiyh multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1991;104(2):230-234.
- 185.Maimone D, Gregory S, Arnason BG, Reder AT. Cytokine levels in the CSF and serum of patients with MS. *J Neuroimmunol* 1991;32:67-74.
- 186.Franciota DM, Grimaldi LM, Martino GV, y col. TNF in serum and CSF of patients with MS. *J Exp Med* 1989;26:787-789.
- 187.Gallo P, Piccinno MG, Krzalic L, Tavolato B. TNF- $\alpha$  and neurological diseases. Failure in detecting TNF- $\alpha$  in the CSF from patients with MS, AIDS dementia complex, and brain tumors. *J Neuroimmunol* 1989;23:41-44.
- 188.Navikas V, He B, Link J, y col. Augmented expression of TNF- $\alpha$  and lymphotoxin mRNA in mononuclear cells in MS and optic neuritis. *Brain* 1996;119:213-223.
- 189.Huang WX, Huang P, Link H, Hillert J. Cytokine analysis in MS by competitive RT-PCR: A decreased expression of IL-10 and increased expression of TNF- $\alpha$  in chronic progression. *Mult Scl* 1999;5:342-348.
- 190.Bertolotto A, Malucchi S, Capobianco M, y col. Quantitative PCR reveals increased levels of TNF- $\alpha$  mRNA in peripheral blood mononuclear cells of MS patients during relapses. *J Interferon Cytokine res* 1999; 19(6):575-81.
- 191.Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, y col. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with MS. *Neurology* 1994;44:1523-1526.

192. Rieckmann P, Albrecht M, Kitzke B, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol* 1995;37:82-88.
193. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An IL-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med* 1998;187(4):537-46.
194. Santambrogio L, Crisi GM, Leu J, et al. Tolerogenic forms of autoantigens and cytokines in the induction of resistance to EAE. *J Neuroimmunol* 1995;58:211-222.
195. Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ. Prevention of EAE by antibodies against IL-12. *J Exp Med* 1995;181:381-386.
196. Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and IL-12 cytokine in MS. *J Exp Med* 1995;182:1985-1996.
197. Balashov KE, Smith DR, Khoury SJ, et al. Increased IL-12 production in progressive MS: Induction by activated CD4<sup>+</sup> T cells via CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:599-603.
198. Nicoletti F, Patti F, Cocuzza C, et al. Elevated serum levels of IL-12 in chronic progressive MS. *J Neuroimmunol* 1996;70:87-90.
199. Okuda Y, Sakoda S, Bernard CC, et al. IL-6-deficient mice are resistant to induction of EAE provoked by MOG. *Int Immunol* 1998;10(5):703-8.

- 200.Frei K, Fredrikson S, Fontana A, Link H. IL-6 is elevated in plasma in MS. *J Neuroimmunol* 1991; 31(2):147-53.
- 201.Shimada K, Koh CS, Yanagisawa N. Detection of interleukin-6 in serum and cerebrospinal fluid of patients with neuroimmunological diseases. *Arerugi* 1993;42(8):934-40.
- 202.Stelmasiak Z, Koziol-Montewka M, Dobosz B, Rejdak K. IL-6 and sIL-6R concentration in CSF and serum of MS patients. *Med Sci Monit* 2001;7(5):914-8.
- 203.Hautecoeur P, Forzy G, Gallois P, y col. Variations of IL2, IL6, TNF alpha plasmatic levels in RRMS. *Acta Neurol Belg* 1997;97(4):240-3.
- 204.Navikas V, Matusевичius D, Söderström M, y col. Increased IL-6 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells in MS. *J Neuroimmunol* 1996;64:63-69.
- 205.Kouwenhoven M, Teleshova N, Ozenci V, y col. Monocytes in MS:phenotype and cytokine profile. *J Neuroimmunol* 2001;112(1-2):197-205.
- 206.Imamura K, Suzumura A, Hayashi F, Marunouchi T. Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in MS patients. *Acta Neurol Scand* 1993;87(4):281-85.
- 207.Beck J, Rondot P, Jullien P, y col. TGF- $\beta$ -like activity produced during regression of exacerbations in MS. *Acta Neurol Scand* 1991;84:452-455.
- 208.Fargeas C, You Wu C, Nakajima T, y col. Differential effects of TGF- $\beta$  on the synthesis of Th1-and Th2-like lymphokines in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992;22:2173-2176.



209. Kennedy MK, Torrance DS, Pincha KS, y col. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* 1992; 149(7):2496-2505.
210. Özenci V, Kounhoven M, Huang YM, y col. Multiple sclerosis: levels of interleukin-10-secreting blood mononuclear cells are low in untreated patients but augmented during interferon-beta-1b treatment. *Scand J Immunol* 1999;49:554-61.
211. Salmaggi A, Dufour A, Eoli M, y col. Low serum interleukin-10 levels in multiple sclerosis; further evidence for decreased systemic immunosuppression. *J Neurol* 1996;243:13-17.
212. Navikas V, Link J, Palasik W, y col. Increased mRNA expression of IL-10 in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. *Scand J Immunol* 1995;41:171-78.
213. Broadley SA, Deans J, Sawcer SJ, y col. Autoimmune disease in first-degree relatives of patients with MS. A UK survey. *Brain* 2000; 123(Pt 6):1102-11.
214. Henderson RD, Bain CJ, Pender MP. The occurrence of autoimmune diseases in patients with MS and their families. *J Clin Neurosci* 2000;7(5):434-437.
215. Heinzlef O, Alamowitch S, Sazdovitch V, y col. Autoimmune diseases in families of French patients with MS. *Acta Neurol Scand* 2000;101(1):36-40.
216. Fredrikson S, Söderström M, Hillert J, y col. MS: occurrence of MBP peptide-reactive T cells in healthy family members. *Acta Neurol Scand* 1994;89(3):184-9.

- 217.Voskuhl RR, Martin R, McFarland HF. A functional basis for the association of HLA class II genes and susceptibility to MS:cellular immune responses to MBP in a multiplex family. *J Neuroimmunol* 1993;42(2) :199-207.
- 218.Joshi N, Usuku K, Hauser SL. The T-Cell Response to Myelin Basic Protein in Familial MS: Diversity of Fine Specificity, Restricting Elements, and T-Cell Receptor Usage. *Ann Neurol* 1993;34(3) :385-93.
- 219.Martin R, Voskuhl R, Flerlage M, y col. MBP-specific T-Cell Responses in Identical Twins Discordant or Concordant for MS.*Ann Neurol* 1993;34:524-535.
- 220.Pette M, Fujita K, Kitze B, y col. Myelin basic protein-specific T lymphocytes from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990;40:1770-1776.
- 221.Lutterotti A, Reindl M, Gassner CH, y col. Antibody response to myelin oligodendrocyte glycoprotein and myelin basic protein depend on familial background and are partially associated with human leukocyte antigen alleles in multiplex families and sporadic multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002;131:201-207.
- 222.Kontinen YT, Kinnunen E, Kemppinen J, y col. Lymphocyte activation in discordant MS twin pairs. *J Neuroimmunol* 1990;27(1):1-8.
- 223.de Jong BA, Schrijver HM, Huizinga TW, y col. Innate Production of IL-10 and TNF Affects the Risk of MS. *Ann Neurol* 2000;48:641-646.
- 224.Popko B, Corbin JG, Baerwald KD, y col. The effects of IFN-gamma on the CNS. *Mol Neurobiol* 1997;14:19-35.

- 225.Özenci V, Kouwenhoven M, Press R, y col. IL-12 ELISPOT assays to detect and enumerate IL-12 secreting cells. *Cytokine* 2000;12:1218-24.
- 226.Durán I, Martínez-Cáceres E, Barberá N, Río J, Tintoré M, Montalbán X. Immunological profile of primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scl* 1998, 4:340-348.
- 227.Karlsson MG, Lawesson SS, Ludvigsson J. Th1-like dominance in high-risk first-degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetologia* 2000;43(6):742-9.
- 228.Hussain MJ, Maher J, Warnock T, y col. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia* 1998;41(3):343-9.
- 229.van der Linden MW, Westendorp RG, Sturk A, y col. High interleukin-10 production in first-degree relatives of patients with generalized but not cutaneous lupus erythematosus. *J Investig Med* 2000;48(5):327-34.
- 230.LLorente L, Richaud-Patin Y, Couderc J, y col. Dysregulation of interleukin-10 production in relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(8):1429-35.
- 231.Grondal G, Kristjansdottir H, Gunnlaugsdottir B, y col. Increased number of interleukin-10 producing cells in systemic lupus erythematosus patients and their first-degree relatives and spouses in Icelandic multicase families.
- 232.Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, y col. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9465-9470.

233. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, y col. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997;349(9046):170-3.
234. Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of IL-6 and its receptor. *Frontiers in Bioscience*, 1; 1996.
235. Rodriguez M, Pavelko KD, McKinney CW, y col. Recombinant human IL-6 suppresses demyelination in a viral model of multiple sclerosis. *J Immunol* 1994;153:3811-3821.
236. Willenborg RO, Fordham SA, Cowden WB y col. Cytokines and murine autoimmune encephalomyelitis: inhibition or enhancement of disease with antibodies to select cytokines, or by delivery of exogenous cytokines using a recombinant vaccinia virus system. *Scand J Immunol* 1995; 41:31-41.
237. Maimone D, Reder AT, Gregory S. T cell lymphokine-induced secretion of cytokines by monocytes from patients with MS. *Cell Immunol* 1993;146(1):96-106.
238. Luscinkas FW, Ding H, Tan P, y col. L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro. *J Immunol* 1996;157(1):326-35.
239. Lewinsohn DM, Bargatze RF, Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J Immunol* 1987;138(12):4313-4321.
240. Jutila MA, Rott L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. *J Immunol* 1989;143(10): 3318-3324

- 241.Kukreti S, Konstantopoulos K, Smith CW, McIntire L. Molecular Mechanisms of Monocyte Adhesion to Interleukin-1 $\beta$ -Stimulated Endothelial Cells Under Physiologic Flow Conditions. *Blood* 1997;89(11):4104-4111.
- 242.Spertini O, Lusinskas FW, Gimbrone MA Jr, Tedder TF. Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions. *J Exp Med* 1992;175(6):1789-92.
- 243.Bond A y Hay FC. L-selectin expression on the surface of peripheral blood leucocytes from rheumatoid arthritis patients is linked to disease activity. *Scand J Immunol* 1997;46(3):312-316.
- 244.Kretowski A, Mysliwiec J, Kinalska I. The alterations of CD11A expression on peripheral blood lymphocytes/monocytes and CD62L expression on peripheral lymphocytes in Graves' disease and type 1 diabetes. *Rocz Akad Med Bialymst* 1999;44:151-159.
- 245.Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Elevated serum L-selectin levels and decreased L-selectin expression on CD8(+) lymphocytes in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2001;124(3):474-479.
- 246.Inaoki M, Sato S, Shimada Y, y col. Decreased expression levels of L-selectin on subsets of leucocytes increased serum L-selectin in severe psoriasis. *Clin Exp Immunol* 2000;122(3):484-492.
- 247.Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989;245(4923):1238-41.

248. Jung TM y Dailey MO. Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein Kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol* 1990;144(8):3130-6.
249. Palecanda A, Walchek B, Bishop DK, Jutila MA. Rapid activation-independent shedding of leukocyte L-selectin induced by cross-linking of the surface antigen. *Eur J Immunol* 1992;22(5):1279-86.
250. Díaz-González F, González-Álvaro I, Campanero MR, y col. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* 1995;95(4):1756-65.
251. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG. Prevention of in Vitro Neutrophil Adhesion to Endothelial Cells through Shedding of L-Selectin by C-Reactive Protein and Peptides Derived from C-Reactive Protein. *J Clin Invest* 1997;100(3):522-529.
252. Hafezi-Moghadam A y Ley K. Relevance of L-selectin Shedding for Leukocyte Rolling In Vivo. *J Exp Med* 1999;189(6):939-947.
253. Pietschmann P, Cush JJ, Lipsky PE, Oppenheimer-Marks N. Identification of subsets of human T cells capable of enhanced transendothelial migration. *J Immunol* 1992;149(4):1170-8.
254. Brezinschek RI, Lipsky PE, Galea P, y col. Phenotypic characterization of CD4+T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity. *J Immunol* 1995;154(7):3062-77.

- 255.Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol* 1992;119(1):229-38.
- 256.Lidington EA, McCormack AM, Yacoub MH, Rose ML. The effects of monocytes on the transendothelial migration of T lymphocytes. *Immunology* 1998;94(2):221-7.
- 257.Reder AT, Genç K, Byskosh PV, Porrini AM. Monocyte activation in MS. *Multiple Sclerosis* 1998;4:162-168.
- 258.Steeber DA, Campbell MA, Basit A, y col. Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires ICAM-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7562-7
- 259.Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, y col. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 1993;177(1):57-68.
- 260.Chuluyan HE, Issekutz AC. VLA-4 integrin can mediate CD11/CD18-independent transendothelial migration of human monocytes. *J Clin Invest* 1993;92(6):2768-77.
- 261.Barrau MA, Montalbán X, Saez-Torres I, y col. CD4(+)CD45RO(+)CD49d(high) cells are involved in the pathogenesis of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000;111(1-2):215-23.
- 262.Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565-568.

- 263.Simpson JE, Newcombe J, Cuzner ML, Woodroffe MN. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other b-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 1998;84:238-244.
- 264.Misu T, Onodera H, Fujihara K, y col. Chemokine receptor expression on T cells in blood and CSF at relapse and remission of MS: imbalance of Th1/Th2-associated chemokine signaling. *J of Neuroimmunol* 2001;114:207-212.
- 265.Quin S, Rottman JB, Myers P, y col. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998;101(4):746-754.
- 266.Barcellos LF, Schito AM, Rimmler JB, y col. CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Genetic Group. Immunogenetics* 2000;51(4-5):281-8.
- 267.Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, y col. Chemokine receptor specific for IP-10 and Mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996,184:963-69.
- 268.Austrup F, Vestweber D, Borges E, y col. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997,385:81-83.
- 269.Kaplan G, Luster AD, Hancock G y Cohn ZA. The expression of a  $\gamma$  interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med* 1987,166:1098-1108.